

# **Die Rolle von Toll-like Rezeptor 3 bei der Aktivierung primärer humaner CD4<sup>+</sup> T- Lymphozyten**



## **DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Tim Meyer**

Kiel

2011

Referent: Professor Dr. Dr. Thomas Bosch

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2011

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### 1 EINLEITUNG

1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Molekulare Grundlagen der T Zell Aktivierung	4
1.3	Mustererkennungsrezeptoren	10

### 2 FRAGESTELLUNG

19

### 3 MATERIAL

3.1	Geräte	20
3.2	Verbrauchsmaterial	20
3.3	Chemikalien und Medien	21
3.4	Antikörper	22
3.5	Inhibitoren	23
3.6	Enzyme	23
3.7	Kits	24
3.8	Puffer und Lösungen	25
3.9	Primer für qRT-PCR	28
3.10	Verwendete Zelllinien	28

### 4 METHODEN

4.1	Zellbiologische Methoden	29
4.2	Molekularbiologische Methoden	38
4.3	Westernblotanalysen	46
4.4	Statistische Analysen	50

### 5 ERGEBNISSE

5.1	Zelluläre Zusammensetzung verwendeter Zellsuspensionen	51
5.2	Poly(I:C) Stimulation verstärkt die durch TZR Stimulation induzierte IFN- $\gamma$ Produktion	52

5.3.	TLR3 Expression in CD4 <sup>+</sup> T Zellen	54
5.4	Auswirkung der Stimulation von TLR3 auf CD4 <sup>+</sup> T Zellen	58
5.5	Der Transkriptionsfaktor IRF3	67
5.6	Der Transkriptionsfaktor NF-κB	71
5.7	Die MAPKinase Kaskade	84
5.8	Auswirkungen der Präinkubation von CD4 <sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C)	86

## 6 DISKUSSION

6.1	TLR3 Expression in CD4 <sup>+</sup> T Zellen	96
6.2	Expression des Aktivierungsmarkers CD69	99
6.3	Zytokin und Chemokin Expression nach TLR3 Stimulation	100
6.4	Der IRF3 Signalweg	103
6.5	Die MAPK Kaskade	106
6.6	Der Transkriptionsfaktor NF-κB	107
6.7	Model der Regulation der Zytokin und Chemokinproduktion	113
6.8	Einfluss von TLR3 auf die Proliferation von CD4 <sup>+</sup> T Zellen	115

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

7.1	Zusammenfassung	118
7.2	Summary	120

## 8 LITERATURVERZEICHNIS 122

## Anhang

Publikationsliste  
 Eidesstattliche Erklärung  
 Lebenslauf  
 Danksagung

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aire	Autoimmun Regulator
AP-1	Aktivator Protein-1
APZ	Antigen präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BZR	B Zellrezeptor
CARD	Caspase Rekrutierungsdomäne
CBP	<i>cAMP responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFDA-SE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CKII	Casein Kinase II
CRAC	<i>Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel</i>
Csk	C-terminale Src Kinase
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen-4
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fetales Kälberserum
Foxp3	<i>forkeheadbox Protein 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
Gads	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
GEFs	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>
GITR	<i>glucocortoid-iduced tumornecrosis factor receptor related protein</i>
GRP	<i>guanyl nucleotide-releasing protein</i>
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
HuPo	humane Polymerase II
IFNAR	IFN- $\alpha/\beta$ Rezeptor
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)-Trisphosphate
IP-10	IFN $\gamma$ -induziertes Protein 10
IPS-1	IFN- $\beta$ -Promotor-Stimulator-1
IRF	Interferon regulierender Faktor

## Abkürzungen

IRFE	IRF bindendes Element
ISG	IFN stimuliertes Gen
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
Itk	<i>IL-2 inducible T-cell kinase</i>
Jak	Janus Kinase
LAT	<i>linker of activation in T cells</i>
LCLV	Lymphozytisches Choriomeningitisvirus
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen assoziierte Protein Kinase
MCMV	murines Zytomegalovirus
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEF	embryonale Fibroblasten der Maus
MEK	MAPK/Erk Kinase
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
MKK	MAP Kinase Kinase
M-WP	MACS Waschpuffer
Myd88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NAP1	<i>NAK-associated protein 1</i>
NEMO	NF- $\kappa$ B essentieller Modulator
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NOD	Nukleotid-bindende-Oligomerisationsdomänen-enthaltende Proteine
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster
PBMZ	mononukleäre Zelle aus peripherem Blut
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin Homologie
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat
PI3-K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC $\theta$	Proteinkinase C $\theta$
PKR	Proteinkinase R
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C $\gamma$ 1
Poly(I:C)	<i>polyinosinic-polycidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
Raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma-1</i>
R $\alpha$ M	Rabbit anti mouse
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell-expressed and -secreted cytokine 1<math>\alpha</math></i>
RasGRP	<i>Ras guanyl nucleotide-releasing protein</i>

## Abkürzungen

RHD	Rel Homologie Domäne
RHIM	RIP homotypisches Interaktionsmotiv
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RIP	Rezeptor interagierendes Protein
RLH	<i>RIG-I-like helicase</i>
RLU	<i>relative light units</i>
ROR $\gamma$ t	<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor <math>\gamma</math> t</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP1	SH2 Domäne enthaltende Protein-Tyrosin Phosphatase
SLP-76	<i>SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAB	TAK bindendes protein
TAK	<i>transforming growth factor <math>\beta</math>-activating kinase</i>
TAM	Tyro3, Axl, Mer(-Rezeptoren)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBK1	TANK-bindende Kinase 1
TIM-3	<i>T cell immunoglobulin domain, mucin domain 3</i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor Homologie
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
Treg	regulatorische T Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TZR	T Zellrezeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
VAF	Virus aktivierter Faktor
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZAP-70	$\zeta$ -Kette-assoziierte Protein Kinase von 70 kDa
ZMV	Zytomegalievirus

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen wird üblicherweise in einen angeborenen und einen adaptiven Bereich unterteilt. Diese Einteilung hat funktionelle, phylogenetische und historische Gründe.

In einer effizienten Immunantwort gegen Pathogene (u.a. verschiedene Bakterien, Viren und mehrzellige Parasiten) und entartete körpereigene Zellen kooperieren das angeborene und adaptive Immunsystem, wobei sich ihre Funktionen zum Teil überschneiden. Ferner wird das Immunsystem durch Interaktion mit anderen Zelltypen beeinflusst.

Eine erste Verteidigungslinie gegen Pathogene stellt die Körperoberfläche selbst dar. Haut und Epithelien bilden eine physische Barriere, die in intaktem Zustand einem Großteil der Pathogene ein Eindringen in den Körper verwehrt. Darüber hinaus sind Epithelien und ihre Sekrete mit einer Vielzahl antimikrobieller Peptide (z.B. Lysozym in Speichel und Tränenflüssigkeit) ausgestattet. Gelingt es mikrobiellen Erregern diese Barrieren zu überwinden, werden sie mit den zellulären (z.B. Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen) und humoralen Komponenten (z.B. das Komplementsystem) der angeborenen Immunität konfrontiert. Gemein ist den beiden Komponenten des angeborenen Immunsystems, dass sie in der Lage sind auch bei erstmaliger Konfrontation mit einem Pathogen dieses anhand von invarianten Pathogen assoziierten Mustern (PAMPs) zu erkennen. Ermöglicht wird dies unter anderem durch die Expression von Keimbahn kodierten Rezeptoren, zu denen im Falle der zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören [1].

Ist das angeborene Immunsystem nicht in der Lage ein Pathogen erfolgreich zu bekämpfen, kommt die adaptive Immunität zum Tragen. Das adaptive Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen Immunsystem in einigen entscheidenden Aspekten:

- der Expression spezifischer Antigenrezeptoren bzw. Antikörper gegen ein Antigen
- der Antigen-Rezeptordiversität bedingt durch somatische Rekombination
- der Möglichkeit der Unterscheidung von körpereigenen und -fremden Peptiden in Zusammenhang mit MHC-Molekülen
- der selektiven Proliferation antigenspezifischer Lymphozyten (klonale Expansion)
- der Ausbildung von Gedächtniszellen, die bei wiederholter Konfrontation mit einem Antigen eine deutlich schnellere Immunreaktion ermöglichen.



Ausgelöst wird die adaptive Immunantwort durch Antigen präsentierende Zellen (APZ), die T und B Zellen aktivieren können. T Zellen sind die Träger der zellulären Immunität und steuern als „Helferzellen“ u.a. die B Zellaktivierung bzw. als „Killerzellen“ die Eliminierung von z.B. Virus infizierten Zellen. B Zellen wiederum gewährleisten die humorale Immunität, indem sie als ausdifferenzierte Plasmazellen Antikörper sezernieren.

### 1.1.1 T Zellreifung

Sowohl T als auch B Zellen entstehen aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen im Knochenmark. Hier entwickeln sich auch die B Zellen, wogegen die Vorläufer der T Zellen in den Thymus wandern. Während der Wanderung der Vorläuferzellen vom Cortex zur Medulla des Thymus kommt es zur Rekombination der Keimbahn-Gensegmente aus denen der T Zellrezeptor (TZR) aufgebaut ist. Abhängig von den Genloci, die für die Ketten des TZR codieren, unterscheidet man  $\gamma\delta$  und  $\alpha\beta$  T Zellen.  $\alpha\beta$  T Zellen, die diesen Differenzierungsschritt erfolgreich gemeistert haben, exprimieren die Oberflächenmoleküle CD2, CD3 und die beiden Korezeptoren CD4 und CD8. Um die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen sicherzustellen, werden diese doppelt positiven Zellen im Thymus mehreren Selektionsschritten unterzogen. Positiv selektioniert werden die Zellen deren TZR in der Lage ist an MHC-I bzw. MHC-II Moleküle auf den Thymus-Zellen zu binden. Ist dies nicht der Fall erhalten die Zellen kein Überlebenssignal und Apoptose wird ausgelöst. Ist die Affinität von TZR zu MHC-Peptid Komplex jedoch zu stark, besteht die Gefahr von Autoreaktivität der T Zelle, wenn sie im peripheren Immunsystem erscheint. In diesem Fall wird ebenfalls Apoptose ausgelöst. Für Toleranz von T Zellen gegenüber Selbstantigenen ist es daher entscheidend, dass im Thymus auch Peptide präsentiert werden, die von Proteinen stammen deren Expression sonst gewebespezifisch erfolgt. Die Expression solcher gewebespezifischer Antigene in Zellen des Thymus wird durch den Transkriptionsfaktor Autoimmun Regulator (Aire) induziert [2]. Lediglich Zellen mit intermediärer Affinität zu MHC-I- bzw. MHC-II-Peptid Komplexen überleben den Selektionsprozeß. Erkennen die Zellen MHC-I Moleküle differenzieren sie zu  $CD8^+$  T Zellen, wird MHC-II erkannt zu  $CD4^+$  T Zellen. Die Zellen sind ab diesem Zeitpunkt einfach positiv, d.h. nur noch einer der beiden Korezeptoren, CD4 oder CD8, wird exprimiert. Sie verlassen den Thymus und besiedeln die sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz.

Hier können die T Zellen von APZ - Makrophagen, B Zellen und in erster Linie dendritische Zellen - aktiviert werden. Unreife dendritische Zellen finden sich in allen Geweben des Körpers. Kommen sie mit einem Pathogen in Kontakt wird dieses endozytiert und degradiert.

Die dendritischen Zellen wandern nun ebenfalls in die sekundären lymphatischen Organe und präsentieren dort den T Zellen MHC gebundene, von Pathogenen stammende Peptide. Wird der MHC-Peptid Komplex von dem TZR erkannt und ist parallel ein kostimulatorisches Signal durch Ligation von CD28 auf der T Zelle durch Mitglieder der B7 Familie (CD80/CD86) auf dendritischen Zellen vorhanden, so wird diese antigenspezifische T Zelle aktiviert [3].

### 1.1.2 T Zellpopulationen

CD8<sup>+</sup> T Zellen können als zytotoxische Zellen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen töten. Sie erkennen über ihren TZR MHC-I-Peptid Komplexe. MHC-I wird von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert. Peptide, die von in der Zelle translatierten Proteinen stammen, werden im Komplex mit MHC-I an der Zelloberfläche präsentiert. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T Zellen können ihre Zielzelle sowohl über den „sekretorischen“ Weg, als auch über Rezeptor-Liganden Interaktion abtöten.

CD4<sup>+</sup> T Zellen erkennen über ihren TZR MHC-II-Peptid Komplexe, die von APZ präsentiert werden. Über MHC-II werden Peptide präsentiert, die nach Degradierung von Proteinen im endo-lysosomalen Kompartiment gebildet wurden. Dies können körpereigene Proteine sein, aber auch Proteine von Pathogenen, die von APZ endozytiert und degradiert wurden. CD4<sup>+</sup> T Zellen sind also auf die Bekämpfung von extrazellulären und im endosomalen Kompartiment vorkommende Pathogene spezialisiert. Diese Aufgabe erfüllen sie als sogenannte Helferzellen indem sie die Sezernierung von Antikörpern durch B Zellen induzieren und die mikrobizide Aktivität von Makrophagen verstärken. Des Weiteren sezernieren CD4<sup>+</sup> T Zellen zahlreiche Chemokine und Zytokine, wodurch Neutrophile, Eosinophile und Basophile rekrutiert werden, sowie das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Immunsystems dirigiert wird. Abhängig davon welche dieser Funktionen sie ausführen bzw. welche Zytokine sie produzieren, werden CD4<sup>+</sup> T Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilt, von denen Th1, Th2, Th17 und regulatorische T Zellen (Treg) am besten charakterisiert sind. [4].

Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen zu Th1-Zellen wird durch die Zytokine Interleukin (IL)-12 und Interferon (IFN)- $\gamma$  ausgelöst und ist durch die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors T-bet gekennzeichnet. Th1-Zellen sezernieren u.a. IL-2, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Durch Sezernierung des Th1 Schlüsselzytokin IFN- $\gamma$  wird eine positive Rückkopplungsschleife etabliert und zugleich die Differenzierung zu Th2-

Zellen unterbunden. In erster Linie sind Th1-Zellen von Bedeutung bei der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien, wie z.B. Mykobakterien [5].

Die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen zu Th2-Zellen wird durch IL-4 induziert, das wiederum von Th2-Zellen selbst produziert wird, was auch hier zu einer positiven Rückkopplung führt. Der Transkriptionsfaktor GATA-3 ist der Hauptregulator der Th2-Differenzierung. Th2-Zellen produzieren u.a. die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-25, wodurch in erster Linie die Proliferation und Differenzierung von B Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen ausgelöst wird. Entsprechend sind Th2-Zellen von wesentlicher Bedeutung für die humorale Immunantwort und somit für die Bekämpfung extrazellulärer Pathogene [5].

Th17-Zellen tragen ihren Namen, da sie IL-17a und IL-17f produzieren. Sie sind durch Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$  t*) gekennzeichnet. Ihre Ausbildung wird durch IL-6, TGF- $\beta$  und IL-23 induziert, das sie auch selbst synthetisieren [6]. IL-17a und IL-17f wirken chemotaktisch auf Neutrophile und aktivieren diese während einer Immunreaktion gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze. Darüber hinaus wirkt IL-17 proinflammatorisch und spielt eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen.

Treg Zellen sind durch Expression des Transkriptionsfaktors *forkheadbox* Protein (FoxP) 3 und starke Expression der  $\alpha$  Kette CD25 des IL-2 Rezeptors („CD25<sup>high</sup>“) gekennzeichnet. Ferner exprimieren Treg weitere Oberflächenmarker wie *glucocorticoid-induced tumornecrosis factor receptor related protein* (GITR). Man unterscheidet natürliche Treg (nTreg) und induzierte Treg (iTreg). Die Differenzierung zu nTreg findet im Thymus statt [5, 7], für ihre Entwicklung scheinen IL-2, TGF- $\beta$  sowie CD28 Kostimulation von entscheidender Bedeutung zu sein. iTreg dagegen entwickeln sich aus naiven peripheren CD4<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation mit TGF- $\beta$  und IL-2 sowie über den TZR [8]. Treg sind von essentieller Bedeutung bei der Begrenzung der Immunantwort und der Inhibition autoreaktiver T Zellen in der Peripherie und damit für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz. Der genaue Mechanismus der Suppression ist ungeklärt, die Expression von TGF- $\beta$  und IL-10 sowie auf Zellkontakt basierende Einflussnahme sind aber je nach Kontext und System von Bedeutung. Die suppressive Aktivität der Treg kann durch TLR2-Liganden partiell aufgehoben werden [9].

## 1.2 Molekulare Grundlagen der T Zell-Aktivierung

Der TZR erkennt MHC-gebundene Peptide auf APZ. Die resultierende T Zell-Aktivierung wird über den TZR assoziierten CD3 Komplex vermittelt. Um diese Aufgabe zu erfüllen ist der

TZR/CD3 Komplex mit zahlreichen Proteinen assoziiert. Darüber hinaus benötigt eine T Zelle zur vollen Aktivierung noch ein zweites Signal, das durch Bindung kostimulatorischer Rezeptoren auf der T Zelle an ihre Liganden auf den APZ zur Verfügung gestellt wird.

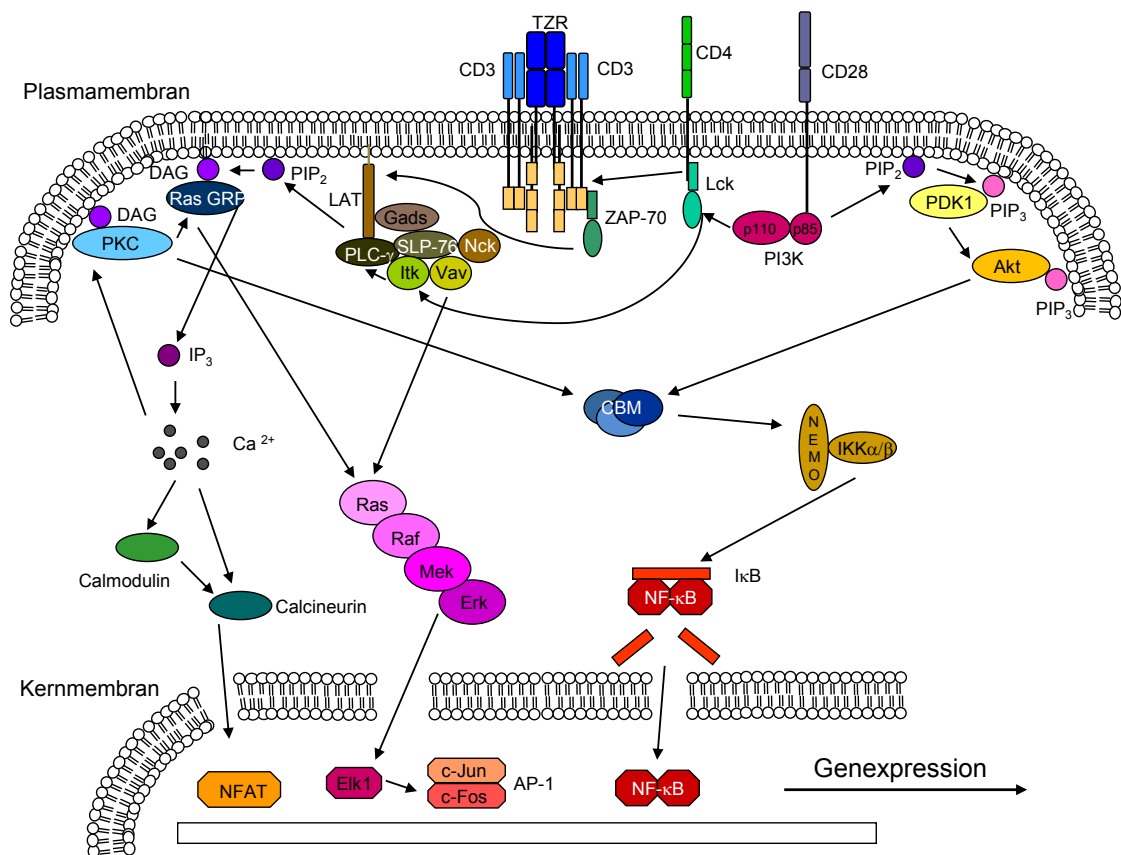
### 1.2.1 Der TZR Signalweg

Der TZR von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T Zellen ist ein Heterodimer und besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Untereinheit, die wiederum aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Domäne aufgebaut sind. Die beiden Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken verbunden und mit den N-Termini in der Zellmembran verankert. Der ins Zytoplasma reichende Teil des TZR ist sehr kurz und bei der Signaltransduktion ins Innere der T Zelle nur indirekt beteiligt. Assoziiert ist der TZR mit dem CD3 Molekülkomplex, Heterodimeren bestehend aus einer  $\gamma$ - und  $\epsilon$ - bzw. einer  $\delta$ - und  $\epsilon$ - Untereinheit, sowie einem Homodimer bestehend aus zwei  $\zeta$  – Untereinheiten. Die CD3 Untereinheiten enthalten je ein Aktivierungsmotiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM), jede  $\zeta$ -Kette drei. Jedes ITAM umfasst zwei Tyrosine, die nach Aktivierung des TZRs phosphoryliert werden und wesentlich für die intrazelluläre Signalweiterleitung (siehe Abb. 1.1) sind. Mittels Quervernetzung der CD3 Moleküle über einen agonistischen Antikörper kann *in vitro* ein TZR-Stimulus nachgeahmt werden.

Notwendig für die Aktivierung einer CD4<sup>+</sup> T Zelle ist die Bindung des Korezeptors CD4 an MHC-II Moleküle. Der zytoplasmatische Teil von CD4 ist mit der Kinase Lck assoziiert, diese kommt so in räumliche Nähe des TZR bzw. der ITAMs und kann jetzt die Tyrosine in den ITAMs phosphorylieren und so die Bindung von Proteinen mit *src homolgy* (SH) 2 Domäne ermöglichen. Ein solches Protein mit SH2 Domäne ist die  $\zeta$ -Kette-assoziierte Protein Kinase mit 70 kDa (ZAP-70). Nach Bindung an die ITAMs wird ZAP-70 selbst durch Lck oder eine weitere Kinase, Fyn, phosphoryliert und dadurch aktiviert. Substrate für ZAP-70 sind die beiden Adaptorproteine *Linker of activation in T cells* (LAT) und *SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa* (SLP-76) [10]. LAT ist palmytiliert und so mit Lipidflößen assoziiert, während SLP-76 im Zytoplasma lokalisiert. Diese beiden Proteine sind von zentraler Bedeutung für die korrekte zeitliche und räumliche Assemblierung des TZR-Signalkomplexes, in LAT- bzw. SLP-76- defizienten Zellen findet nahezu keine TZR induzierte Signalgebung mehr statt [10, 11].

LAT enthält neun Tyrosine und kann im phosphorylierten Zustand andere Proteine mit SH2 Domänen binden, darunter die Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), die p85 Untereinheit der

Lipidkinase Phosphoinositid 3-Kinase (PI3-Kinase), *Grb2-related adaptor downstream of Shc* (Gads) und *Guanine-nucleotide exchange factors* (GEFs).



**Abbildung 1.1:** Schematische Übersicht des TZR-Signalwegs

SLP-76 bindet ebenfalls an Gads und wird an LAT rekrutiert. SLP-76 umfasst drei Domänen. Eine beinhaltet phosphorylierbare Tyrosine über die die Interaktion mit dem Guanosin-Austauschfaktor (GEF) Vav1, dem Adapterprotein Nck und Tec-Kinasen wie *IL-2 inducible T-cell kinase* (Itk) vermittelt wird. Eine weitere Domäne umfasst eine prolinreiche Region zur Bindung von SH3-Domänen über die die konstitutive Bindung von Gads und PLC $\gamma$ 1 erfolgt, sowie eine C-terminale SH2 Domäne.

Zahlreiche der zu LAT/SLP-76 rekrutierten Proteine binden an beide Adaptorproteine und zum Teil auch untereinander. Es wird davon ausgegangen, dass dadurch der korrekte räumliche und zeitliche Aufbau der Signalplattform sichergestellt wird.

Zentrale Bedeutung für die TZR induzierte Signaltransduktion hat die Phosphorylierung und Aktivierung von PLC $\gamma$ 1 durch Itk, ZAP70 und Lck. Aktivierte PLC $\gamma$ 1 hydrolysiert das

Membranlipid Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositol (1,4,5)-Trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).

Über DAG werden zwei der wichtigsten Signalwege nach TZR-Stimulation aktiviert, die Mitogen assoziierte Protein Kinase (MAPK) Kaskade sowie der Transkriptionsfaktor *nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) [10].

Die Proteinkinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ) umfasst eine Lipid bindende Domäne und bindet mittels dieser an DAG. Der GEF Ras *guanyl nucleotide-releasing protein* (RasGRP) besitzt ebenfalls eine DAG-bindende Domäne und wird nach Rekrutierung zur Membran durch PKC $\theta$  phosphoryliert. Durch RasGRP wird das G-Protein Ras und durch dieses die MAPK Kinase Kinase Raf-1 (*Rapidly accelerated fibrosarcoma-1*) aktiviert. Raf bindet und phosphoryliert die MAPK Kinasen MEK 1 und 2. Am Ende der MAPK-Kaskade erfolgt die Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase 1* (Erk1) und Erk2, die den Transkriptionsfaktor Elk1 phosphorylieren. Dieser trägt zur Aktivierung des Aktivator Protein-1 (AP-1)-Transkriptionsfaktor-Komplexes bei, indem er die Expression der AP-1 Untereinheit Fos induziert. p38 ist eine weitere MAPK, von der vier p38 Isoformen bekannt sind, p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , und  $\delta$ , wobei die  $\alpha$  Isoform 50% Homologie zu ERK2 aufweist. p38 wird durch einen ähnlichen, aber distinkten Mechanismus wie ERK1/2 aktiviert. Bei den beteiligten MAPK Kinase Kinasen handelt es sich um die MEK Kinasen 1 bis 4, als MAPK Kinasen sind MEK 3 und 6 beteiligt. Der Aktivierungsmechanismus ist sich also sehr ähnlich, wird aber durch unterschiedliche Kinasen vermittelt. Außer durch den TZR Signalweg können die MAPK ERK1/2 und p38 auch durch eine Vielzahl weiterer Stimuli aktiviert werden: ERK1/2 in Reaktion auf Wachstumsfaktoren, während p38 durch verschiedene Zytokine, aber auch durch Zellstress wie z.B. osmotischen Schock, aktiviert wird [12]. In Abb. 1.1 ist der Übersicht halber nur die MAPK Kaskade, die ERK1/2 aktiviert, dargestellt.

PKC $\theta$  ist auch bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beteiligt. Die NF- $\kappa$ B Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus 5 Mitgliedern, NF- $\kappa$ B1 (p50 bzw. p105), NF- $\kappa$ B2 (p52 bzw. p100), RelA (p65), RelB und c-Rel. Die häufigste Form von NF- $\kappa$ B ist ein Heterodimer, bestehend aus p65 und p50. Der N-Terminus der Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie umfasst eine konservierte Rel Homologie Domäne, welche die Dimerisierung der Untereinheiten, die Kerntranslokation und die DNA Bindung vermittelt. Die Expression von Zielgenen wird jedoch nur von p65, RelB und c-Rel aktiviert, nur sie beinhalten eine C-terminale Transaktivierungsdomäne. p50 und p52 dagegen wirken als Transkriptionsrepressoren [13].

Abhängig von Stimulus und Zellpopulation formen sich nach Aktivierung Homo- oder Heterodimere, die unterschiedliche Gene regulieren können. Die genauen Mechanismen, die die transkriptionelle Spezifität sicherstellen sind nur ansatzweise verstanden und umfassen die Dimerzusammensetzung, Rekrutierung von Kofaktoren, Chromatinreorganisation und posttranslationale Modifikationen der NF- $\kappa$ B Untereinheiten [14].

In unstimulierten T Zellen liegt NF- $\kappa$ B im Zytosol assoziiert mit dem Inhibitor von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) vor. Nach Aktivierung der T Zelle phosphoryliert PKC $\theta$  das Adaptorprotein *caspase recruitment domain* (CARD) und *membrane associated guanylate kinase* (MAGUK) enthaltende Protein (CARMA1), das nun oligomerisiert und mit Bcl10 interagiert. Nach Inkorporation des *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1* (MALT1) trägt der CARMA1/Bcl10/MALT1 (CBM) Komplex zur NF- $\kappa$ B Aktivierung bei, indem er die Ubiquitinierung der regulatorischen Untereinheit NF- $\kappa$ B Essential Modulator (NEMO) des I $\kappa$ B Kinase Komplexes (IKK) erleichtert [10]. Die Ubiquitinierung erfolgt durch eine multiple Komponenten umfassende Ubiquitin Ligase und führt zur Degradation von IKK im 26S Proteasom [15]. NF- $\kappa$ B kann nun in den Kern translozieren und als Transkriptionsfaktor wirken.

IP<sub>3</sub> stimuliert IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, was zur Öffnung von Ca<sup>2+</sup> Kanälen in der ER-Membran führt. Der Ca<sup>2+</sup> Influx wird verstärkt und aufrechterhalten durch Öffnung von Ca<sup>2+</sup> *release-activated* Ca<sup>2+</sup> (CRAC) Kanälen in der Plasmamembran. Ca<sup>2+</sup> bindet und aktiviert Calmodulin, diese beiden Faktoren kooperieren bei der Aktivierung von Calcineurin. Die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, wodurch dieser aktiviert wird. Unter anderem kooperiert NFAT mit *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Proteinen bei der Th1/Th2 Differenzierung [16].

### 1.2.2 Der CD28 Signalweg

Die Stimulation des TZR ist allein nicht ausreichend für die volle Aktivierung der T Zelle. Erhält die Zelle zusätzlich zum TZR-Stimulus keine kostimulatorischen Signale so wird sie in den Zustand der Anergie überführt. Dieser Ruhezustand, in dem die T Zelle in der Regel nicht erneut aktiviert werden kann, dient der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Entkommen autoreaktive Zellen der Selektion im Thymus so können sie über diesen Mechanismus deaktiviert werden.

Wichtigster kostimulatorischer Rezeptor auf T Zellen ist das Oberflächenmolekül CD28. CD28 bindet an CD80 oder CD86, Mitglieder der B.7 Familie, die auf der Zelloberfläche von

APZ exprimiert werden. Die Reifung von dendritischen Zellen, einer wichtigen Gruppe der APZ, aus Vorläuferzellen kann u.a. durch Stimulation mit *toll-like* Rezeptor (TLR) Liganden ausgelöst werden [17].

Nach Ligation von CD28 an CD80/86 kann die p85 regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid 3 (PI3)-Kinase an den zytoplasmatischen Teil von CD28 binden und die p110 katalytische Untereinheit rekrutieren. Diese konvertiert Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> kann von Proteinen mit Pleckstrin Homologie (PH)-Domänen gebunden werden, z.B. der *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK1) und ihrem Substrat Akt. Akt ist ebenfalls eine Kinase und in der Lage Einfluss auf zahlreiche Prozesse der T Zellaktivierung zu nehmen. So erleichtert Akt die Bildung des CBM Komplexes und verstärkt dadurch die Kerntranslokation von NF-κB [18]. Auch die Aktivität von NFAT wird positiv beeinflusst. PIP<sub>3</sub>-Interaktionen spielen auch bei der Rekrutierung von Itk und Lck zur Membran und somit in räumliche Nähe zu dem TZR-Komplex eine Rolle. Nach CD28 Kostimulation kommt es zu einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren wie IL-2 und anti-apoptischen Proteinen wie Bcl-xl, sowie zur Inhibition von Transkriptionsfaktoren, die eine Progression des Zellzyklus verhindern.

Die vollständige Aktivierung einer T Zelle induziert deren Proliferation, Differenzierung sowie Zytokinproduktion und befähigt sie so einen wesentlichen Beitrag zu der Immunantwort zu leisten.

### 1.2.3 Beendigung der Immunantwort

Nach Eliminierung eines Pathogens bedarf es der zügigen Beendigung der Immunantwort. Wird dieser Schritt nicht korrekt reguliert kann dies zu anhaltender T Zellproliferation verbunden mit Splenomegalie und Lymphozyteninfiltration multipler Organe, verstärkter Antikörperproduktion und Autoimmunität führen. Es sind zahlreiche inhibitorische Moleküle bekannt die an verschiedenen Schritten der T Zellaktivierung wirken. Darunter sind Kinasen wie die C-terminale Src Kinase (Csk), die Lck an einem inhibitorisch wirkenden Tyrosin phosphoryliert [19], und Phosphatasen wie die SH2-Domäne enthaltende Protein-Tyrosin Phosphatase (SHP1), die Lck an ihrer Reaktionsdomäne dephosphoryliert [20], sowie die Serin-Threonin Phosphatase PP2A, die über eine regulatorische Untereinheit mit CARMA1 interagiert, dephosphoryliert und so die CBM-Komplex Formation verhindert [21]. Bei der Rekrutierung von SHP1 sind die Oberflächenproteine zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4) und *programmed death-1* (PD-1) beteiligt [10]. CTLA-4 bindet darüber hinaus an



CD80 und CD86 wodurch diese nicht mehr mit CD28 interagieren können und kein kostimulatorisches Signal mehr vermittelt wird [22]. Für die spezifische Herunterregulation der Aktivität von Th1 Zellen ist das Oberflächenmolekül *T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3* (TIM-3) wichtig. Eine verminderte Expression von TIM-3 auf CD4<sup>+</sup> T Zellen geht mit verstärkter Proliferation und IFN- $\gamma$  Expression einher [23].

### 1.3 Mustererkennungsrezeptoren

Bei der Abwehr von mikrobiellen Erregern ist es für alle Metazoa von essentieller Bedeutung zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden. T Zellen wird diese Eigenschaft durch Selektion im Thymus verliehen, wo autoreaktive T Zellen, d.h. Zellen die MHC-präsentierte Selbst-Peptide erkennen, negativ selektioniert werden. Zellen der angeborenen Immunität, aber auch Fibroblasten und Epithelzellen können mikrobielle Erreger über Muster-Erkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRRs) identifizieren. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem die *RIG-I-like helicases* (RLHs), Proteinkinase R (PKR), *NOD-like receptors* (NLRs) und TLRs. All diese Rezeptoren sind keimbahncodiert und somit im Gegensatz zum TZR und dem B Zellrezeptor (BZR) invariant. Ihnen gemein ist, dass sie Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen, die für Mikroorganismen von essentieller Bedeutung sind und auch unter Selektionsdruck kaum verändert werden können. So erkennen die Nukleotid-bindende-Oligomerisationsdomänen-enthaltende Proteine (NOD) 1 und NOD2 Peptidoglykane die Zellwandbestandteile von Gram negativen (NOD1 und 2) und Gram positiven (NOD2) Bakterien darstellen. Zu den zytoplasmatisch lokalisierten RLHs gehören u.a. *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5). RIG-I und MDA-5 bestehen aus einer DExD/H box Helicase Domäne und zwei Caspase Rekrutierungsdomänen (CARD). MDA-5 und RIG-I aktivieren wie TLR3 die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und Interferon regulierender Faktor (IRF)-3. Dabei dient der IFN- $\beta$ -Promotor-Stimulator-1 (IPS-1) als Adaptormolekül. MDA-5 und RIG-I interagieren mit viraler RNA, von RIG-I ist bekannt, dass es einzelsträngige (*single stranded RNA*, ssRNA) und doppelsträngige RNA (*double stranded RNA*, dsRNA) mit einem 5'-Triphosphat (5'-PPP) erkennt [24]. 5'-PPP kommt im Zytoplasma gesunder eukariotischer Zellen nicht vor, stellt aber ein häufiges Intermediat während der Replikation von Viren dar. PKR, deren Expression durch Interferon (IFN) induziert wird, erkennt ebenfalls RNA. Im Gegensatz zu RLHs, PKR und NLRs, die im Zytoplasma lokalisiert sind, handelt es sich bei TLRs um Typ I integrale Membranproteine. Im Menschen sind bisher 10 verschiedene TLRs bekannt, wobei für TLR10 der Ligand noch unbekannt ist (siehe Tab. 1.1).

**Tabelle 1.1:** Humane Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Rezeptor	Ligand	Rezeptor	Ligand
TLR1/2	triacetylierte Lipopeptide	TLR7	ssRNA
TLR2/6	diacetylierte Lipopeptide	TLR8	ssRNA
TLR3	dsRNA	TLR9	CpG DNA
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS)	TLR10	unbekannt
TLR5	Flagellin		

Alle TLRs die Oberflächenstrukturen von Pathogenen erkennen (TLR1, 2, 4, 5, 6) werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wogegen Nukleinsäure erkennende TLRs (TLR3, 7, 8, 9) überwiegend im endo-lysosomalen Kompartiment vorkommen. Für TLR3 ist aber auch eine teilweise Oberflächenexpression in Fibroblasten, epithelialen Zellen und aktivierten  $\gamma\delta$  T Zellen beschrieben [25-27]. TLR3 erkennt doppelsträngige (ds) RNA sowie das synthetische Analog *polyinosinic-polycidylic acid* (poly(I:C)). Im Zytoplasma gesunder eukariotischer Zellen kommt dsRNA praktisch nicht vor. Das Genom einiger Viren dagegen, z.B. das der Reoviren besteht aus dsRNA, und darüber hinaus ist dsRNA Intermediat bei der Replikation zahlreicher weiterer Viren [28]. Aktivierung von TLR3 löst unter anderem die Expression von Typ I Interferonen (IFN) aus, die bei der Bekämpfung von viralen Infektionen eine zentrale Rolle spielen. Typ I IFN umfassen verschiedene Subtypen, darunter IFN- $\beta$  und zahlreiche Subtypen von IFN- $\alpha$ .

### 1.3.1 TLR3-Struktur und Ligandenbindung

Alle TLRs setzen sich aus einer Ektodomäne, die für die Bindung der Liganden notwendig ist und einer intrazellulären Domäne, die die Signalweiterleitung gewährleistet, zusammen. Die Ektodomäne umfasst je nach TLR 18-25 hintereinander angeordnete Kopien eines *leucine-rich-repeat* (LRR)-Motivs, der intrazelluläre Teil beinhaltet eine Toll/Interleukin-1 Rezeptor Homologie (TIR)-Domäne die Adaptormoleküle wie *Myeloid differentiation primary response gene 88* (Myd88) und *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) rekrutieren kann.

Die TIR-Domäne umfasst ca. 200 Aminosäuren und beinhaltet drei hochkonservierte Bereiche. Für die intrazelluläre Lokalisation von TLR3 im endo-lysosomalen Kompartiment ist der Linkerbereich zwischen TIR-Domäne und der Transmembran-Domäne ausschlaggebend. Ist der Linkerbereich deletiert wird TLR3 auf der Zelloberfläche exprimiert [29, 30].

Der Übertritt von TLR3 vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Endolysosom wird von dem Transmembranprotein UNC93B1 vermittelt, dass mit der Transmembrandomäne von TLR3 (und TLR7 bzw. 9) in Wechselwirkung tritt [31-33]. Mutationen im UNC93B Gen wurden bei zwei Patienten mit schwerer Herpes Simplex Virus (HSV) Enzephalitis nachgewiesen.

Die TLR3-Ektodomäne umfasst 23 LRRs, die hufeisenförmig angeordnet sind. Die Ektodomäne ist stark glykosyliert, lediglich die laterale Oberfläche ist frei von Zuckermodifikationen. Wird die Glykosylierung durch Inhibitoren gehemmt, so findet keine Signaltransduktion nach TLR3 Stimulation mehr statt. Es wird angenommen, dass in dem unglykosylierten Bereich Rezeptor-Ligand Interaktionen stattfinden. Voraussetzung für die Ligand Bindung ist ein niedriger pH-Wert. Während es bei neutralem pH zu keiner Interaktion zwischen dsRNA und TLR3 kommt, nimmt die Affinität mit sinkendem pH zu und erreicht ein Maximum bei pH 4,2 [34]. TLR3 bindet als Dimer an dsRNA, wobei vermutlich die Symmetrie des Liganden dazu führt, dass zwei TLR3 Moleküle zueinander um 180° gedreht an den Liganden binden [35]. Um eine Bindung zu ermöglichen muss der Ligand mindestens eine Länge von 45 Basenpaaren (bp) aufweisen, wodurch die intrazellulären C-Termini in räumliche Nähe zueinander gelangen und die Signaltransduktion ermöglichen [36, 37].

Wie genau der TLR3 Ligand in die Zelle gelangt und dort mit dem Rezeptor in Wechselwirkung tritt ist bis heute nicht eindeutig geklärt. In murinen Makrophagen ist CD14 wesentlich für die Aufnahme von poly(I:C) [38]. Daneben wurde eine Beteiligung von Clathrin vermittelter Endozytose sowie von Autophagie [39, 40] gezeigt.

### 1.3.2 TLR3 Signaltransduktion

#### 1.3.2.1 Das Adaptormolekül TRIF

TLR3 ist der einzige TLR, der nicht das Adaptormolekül Myd88 für seine Funktion benötigt. Stattdessen erfolgt die Signalweiterleitung über TRIF, das sonst lediglich noch bei der TLR4 Signaltransduktion eine Rolle spielt [41].

Die über TRIF aktivierten Transkriptionsfaktoren sind NF- $\kappa$ B und IRF3 (siehe Abb. 1.2) [37]. TRIF umfasst eine prolinreiche N-terminale Region, eine TIR-Domäne und ein C-terminales RIP homotypisches Interaktionsmotiv (RHIM). In ruhenden Zellen ist TRIF diffus verteilt im Zytoplasma nachweisbar. Nach TLR3 Stimulation wird TRIF vorübergehend zu dem Rezeptor rekrutiert, oligomerisiert mittels der TIR-Domäne und der C-terminalen Region, dissoziiert dann vom Rezeptor und kolokalisiert mit Adaptor- und Signamolekülen im

Zytoplasma [37]. Tatematsu und Kollegen offerieren hierfür ein Modell, bei dem im nicht aktivierten Zustand die N-terminale Domäne zur TIR Domäne zurückfaltet. Durch Interaktion der TIR-Domänen kommt es nach TLR3 Stimulation zu einer Konformationsänderung, die die Bindung von Adaptor- und Signamolekülen ermöglicht. [42].

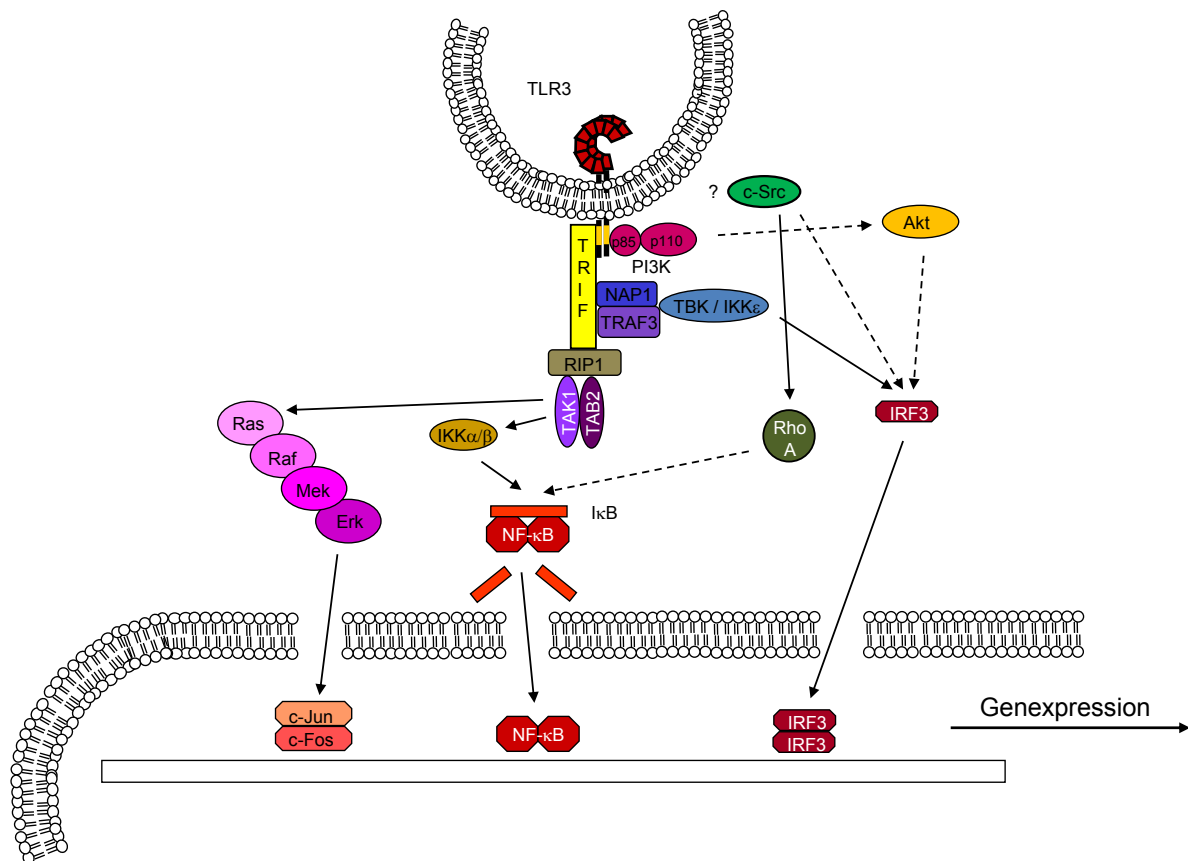
Über die Adaptormoleküle *NAK-associated protein 1* (NAP1) und *TNF receptor-associated factor 3* (TRAF3), die an die TIR Domäne binden, interagiert TRIF mit den Kinasen I $\kappa$ B Kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) und TANK-bindende Kinase 1 (TBK1), die bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 beteiligt sind (siehe 1.3.3.2). In NAP1-siRNA behandelten bzw. TRAF3 defizienten Zellen kommt es im Gegensatz zu Wildtypzellen nicht mehr zu einer IFN- $\beta$  Induktion nach TLR3 Stimulation [37].

NF- $\kappa$ B Aktivierung ist abhängig von der Interaktion zwischen TRIF und dem Rezeptor interagierenden Protein 1 (RIP1), die über die RHIM-Domäne vermittelt wird. Das RHIM befindet sich am C-Terminus von TRIF und ist nicht Teil der TIR-Domäne. In RIP1 defizienten embryonalen Mäusefibroblasten ist poly(I:C) induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung im Gegensatz zu Wildtypzellen nicht mehr nachweisbar [43].

Neben der Signalweiterleitung ist TRIF möglicherweise auch noch involviert in die proteolytische Degradation zahlreicher TLRs, darunter TLR3. So führt die Überexpression von TRIF in humanen epithelialen Kolonzellen zur Degradation von TLR3, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 [44].

Neben der Assoziation mit TRIF ist die Phosphorylierung von zwei Tyrosinen, Tyrosin 759 und Tyrosin 858, im zytoplasmatischen Teil von TLR3 entscheidend für die Signaltransduktion. Phosphoryliertes Tyrosin 759 dient als Andockstelle für die PI3-Kinase, Phosphorylierung von Tyrosin858 wird für die volle Aktivierung von IRF3 benötigt.

Auch von c-Src ist nach poly(I:C) Stimulation eine Kollokalisierung mit TLR3 beschrieben, jedoch ist nicht bekannt wie diese Interaktion vermittelt wird. c-Src ist sowohl an der Aktivierung von der IRF3 als auch von NF- $\kappa$ B beteiligt. Bei der Signaltransduktion zu NF- $\kappa$ B wird auch die Src abhängige GTPase RhoA benötigt, die aber bei der Aktivierung der Typ I-IFN Expression keine Rolle spielt [45, 46].



**Abbildung 1.2:** Schematische Übersicht über den TLR3 Signalweg

### 1.3.2.2 TRIF vermittelte Signaltransduktion

Die TLR3 Signalwege sind zum Teil identisch mit den TLR4 Signalwegen. So können ebenfalls NF- $\kappa$ B, die MAPK-Kaskade und die PI3-Kinase aktiviert werden, der Transkriptionsfaktor IRF3 hingegen wird nur durch TLR3 nicht aber durch den TLR4 aktiviert. IRF3 wird konstitutiv exprimiert und lokalisiert in unstimulierten Zellen im Zytoplasma. Er bindet an DNA Sequenzen, die ein IFN-stimulated response Element (ISRE) beinhalten, darunter Enhancer-Promotor Sequenzen von IFN- $\beta$ .

Nach TLR3 Stimulation werden wie unter 1.3.2.1 erwähnt die Kinasen IKK $\epsilon$  und TBK1 zu TRIF rekrutiert. Zur vollständigen Aktivierung von TBK1 ist die Phosphorylierung von TLR3-Tyr858 notwendig. IKK $\epsilon$  und TBK1 phosphorylieren Serin/Threonin Gruppen der regulatorischen Domäne am C-Terminus von IRF3, phosphoryliertes IRF3 homodimerisiert und ist in der Lage in den Kern zu translokieren, jedoch nicht die Transkription von Zielgenen zu induzieren. Voraussetzung hierfür ist die Phosphorylierung von TLR3 an Tyr759. Hierdurch kommt es zur Rekrutierung der PI3-Kinase zu TLR3. Erst nach diesem Schritt wird

IRF3 an weiteren, bisher unidentifizierten Aminosäuren phosphoryliert. Sowohl die Aktivität der PI3-K, als auch die Aktivität der nachgeschalteten Kinase Akt sind Voraussetzung dafür. Es ist aber unwahrscheinlich, dass die zusätzliche IRF3 Phosphorylierung direkt durch eine dieser beiden Kinasen erfolgt. Nur vollständig phosphoryliertes IRF3 interagiert im Nukleus mit *cAMP responsive-element-binding protein (CREB)-binding protein* (CBP) [47]. Die Kooperation mit CBP, NF- $\kappa$ B und dem AP-1 Komplex ist jedoch Voraussetzung für die Bindung an die Enhancer-Promotor Region von IFN- $\beta$ .

Wie unter 1.3.2.1 ausgeführt, assoziieren RIP1 und TRAF6 nach Aktivierung von TLR3 mit TRIF. RIP1 wird ubiquitiniert und rekrutiert daraufhin *transforming growth factor  $\beta$ -activating kinase* (TAK1) und *TAK binding protein* (TAB) 2. TAK1 phosphoryliert IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , die wiederum den NF- $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B phosphorylieren. I $\kappa$ B wird degradiert und NF- $\kappa$ B transloziert in den Nukleus. Ähnlich wie bei IRF3 ist auch für die vollständige Aktivierung von NF- $\kappa$ B Phosphorylierung von TLR3 an Tyr759 Voraussetzung. Ist sie nicht gegeben lässt sich zwar NF- $\kappa$ B im Kern nachweisen, die Transkription von Zielgenen findet aber nicht statt. Auch in diesem Fall ist dies auf eine unzureichende Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B, bzw. p65, zurückzuführen. Nach Sarkar und Kollegen ist die PI3-Kinase bei diesem Vorgang nicht beteiligt [48]. Aksoy und Kollegen berichten dagegen, dass Inhibition der PI3-K in humanen dendritischen Zellen die TLR3 induzierte NF- $\kappa$ B Aktivität verstärkt [49].

Sowohl die NF- $\kappa$ B-, als auch die IRF3-Aktivierung sind also mehrstufige Prozesse. In beiden Fällen ist der Signalweg über TRIF ausreichend, um Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Kern auszulösen, nicht aber um die volle Aktivität zu gewährleisten. Jedoch mag es auch hier Stimulus, Zellpopulation- und Zielgenspezifische Unterschiede geben. Auch ist durch Überexpression von TRIF ein Fehlen der TLR3 Phosphorylierung zu ersetzen [37].

Auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 erfolgt über die Aktivität von TAK1. Durch sie werden die MAP-Kinase, p38 und Erk1/2 aktiviert.

### 1.3.2.3 Negativregulation des TLR3 Signalweges

Es sind vielfältige Mechanismen der Negativregulation des TLR3 Signalwegs bekannt, in diesem Kontext werden jedoch nur einige beispielhaft aufgeführt. Unter 1.3.2.2 bereits erwähnt ist die inhibitorische Wirkung der PI3-K Aktivität auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Daneben gibt es zahlreiche Regulatoren die über Interaktion mit TRIF den Signalweg beeinflussen. So ist das Protein *Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein* (SARM)

in der Lage über eine TIR Domäne TRIF zu binden und die Transkription von TLR3 induzierten Zielgenen zu unterbinden. Auch TRAF4, das durch TLR4 und TLR9 Stimulation induziert wird, interagiert mit TRIF und darüber hinaus mit TRAF6 und inhibiert so die TLR3 induzierte Signaltransduktion. Der Regulator A20 wird durch NF- $\kappa$ B induziert, assoziiert mit TRIF, TBK1 und IKK $\epsilon$  und inhibiert sowohl die IRF3- als auch NF- $\kappa$ B-Aktivität [37].

Die Rezeptoren Tyro3, Axl und Mer (TAM) interagieren mit aktivierten IFN- $\alpha/\beta$  Rezeptoren (IFNAR) und induzieren über den STAT1-Signalweg die Expression von *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) Proteinen, die ebenfalls mit dem TLR3 Signalweg, genauer mit der Aktivierung von Erk1/2, p38, NF- $\kappa$ B sowie der Expression von Typ I IFN, interferieren [50].

Der Transkriptionsfaktor IRF7 ist in TLR3 stimulierten Zellen Teil einer positiven Rückkopplungsschleife, die die Typ I IFN Expression aufrecht erhält. Das Protein MyD88 *adaptor-like* (Mal) bindet an IRF7 und hemmt so die IFN- $\beta$ , nicht aber die TNF- $\alpha$  Expression nach TLR3 Stimulation [51].

Neben diesen zellulären sind auch virale Negativregulatoren bekannt, durch die die effektive antivirale Signaltransduktion verhindert oder zumindest verzögert werden kann. So exprimiert *Vaccinia Virus* das Protein A46R, das an die TIR Domäne bindet und so TLR und IL-1 Rezeptor Signalwege blockiert, sowie A52R, das TRAF6 und N1L, das TBK1 inhibiert. Das Hepatitis C Virus codiert für die Protease NS3/4, die TRIF degradiert und das West Nil Virus exprimiert den Faktor NS-1, der über bisher unbekannte Mechanismen die Kerntranslokation von NF- $\kappa$ B und IRF3 verhindert. Die Notwendigkeit für Viren den TLR3 Signalweg zu inhibieren unterstreicht die Bedeutung von TLR3 in der Bekämpfung von viralen Infektionen [37].

### 1.3.3 Die Bedeutung von TLR3 bei viralen Infektionen

Für die Abwehr einer viralen Infektion ist das Zusammenspiel zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Teil des Immunsystems essentiell. Wichtige Funktionen des adaptiven Immunsystems bestehen in der Produktion von Antikörpern gegen Viren und der zytotoxischen Aktivität von T Lymphozyten. Bevor diese Funktionen des adaptiven Immunsystems zum Tragen kommen können, beruht die antivirale Abwehr auf Erkennung viraler Strukturen durch PRRs. Dies führt, wie unter 1.3.2.2, geschildert zu der Expression von Typ I IFN, die Schlüsselfaktoren für eine schnelle Immunreaktion gegen Viren darstellen [52]. Typ I IFN binden an den Typ I IFN Rezeptor, der sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt. Die beiden Untereinheiten sind mit Janus Kinasen (Jak) assoziiert, welche

wiederum nach Bindung des Liganden aktiviert werden. Substrate der Jaks sind *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) Moleküle, die nach Phosphorylierung dimerisieren, in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren wirken. Aktiviert werden eine Vielzahl von Interferon stimulierten Genen (ISGs), die Einfluss auf die Translation, Zellproliferation und das Überleben von Zellen nehmen und diese in einen „antiviralen Status“ überführen [53].

Neben Typ I IFN ist auch das Typ II IFN IFN- $\gamma$  wichtig für die Immunreaktion gegen Viren. Dabei wird die Bedeutung von IFN- $\gamma$  in erster Linie in späteren Phasen der Bekämpfung von Viren gesehen. IFN- $\gamma$  erhöht die Aktivität von Makrophagen, verstärkt die zytolytische Aktivität von NK Zellen, induziert verstärkte Expression von MHC I und MHC II Molekülen und löst die Differenzierung von B und T Zellen aus [54]. Neben Typ I IFN werden durch eine Virusinfektion auch die Expression zahlreicher chemotaktischer Faktoren wie z.B. *regulated upon activation, normal T cell-expressed and -secreted cytokine* (RANTES), Monozyten chemoattraktierendes Protein (MCP) -1, Makrophagen inflammatorisches Protein (MIP)1- $\alpha$ , Interferon  $\gamma$ -induziertes Protein (IP) -10, IL-8 und proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  eingeleitet [55]. Die Chemokine rekrutieren Effektorzellen zu dem Ort der Virusinfektion.

Aufgrund der zahlreichen Rezeptoren, die in der Lage sind Nukleinsäuren viralen Ursprungs zu erkennen und der daraus resultierenden Redundanz, ist es zum Teil schwierig die *in vivo* Relevanz von TLR3 einzugrenzen. Splenozyten aus Wildtyp-, nicht aber aus TLR3 defizienten Mäusen erkennen *in vitro* aufgereinigte genomische dsRNA von Reoviren. TLR3 defiziente Mäuse dagegen zeigen keine erhöhte Anfälligkeit gegen Infektion mit Reoviren. Auch bei Infektion mit dem Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), dem Lymphozytischen Choriomeningitisvirus (LCMV) und dem murinen Zytomegalovirus (MCMV) sind die T Zellreaktion nach Edelmann et al. vergleichbar zwischen Wildtyp- und TLR3-defizienten Mäusen [56]. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe dagegen ergaben, dass TLR3 -/- Mäuse nach MCMV Infektion geringere Mengen Typ I IFN und IFN- $\gamma$  im Serum aufweisen und die IFN- $\gamma$  Produktion durch NK und NK-T Zellen verringert ist. Diese divergierenden Ergebnisse mögen darin begründet sein, dass Reaktionen verschiedener Zelltypen analysiert wurden. Auch wurden verschiedene Mausstämme verwendet und diese wurden mit verschiedenen Virusmengen infiziert [57].

Bei Infektion mit verschiedenen weiteren Viren weisen TLR3-defiziente Mäuse sogar eine höhere Lebenserwartung auf als Wildtypmäuse. Ferner kommt es in Wildtypmäusen bei Infektion mit dem West Nil Virus, mit Influenza A und dem Punta Toro Virus zu einer höheren



Expression von proinflammatorischen Mediatoren, als in TLR3 defizienten Mäusen. Bei allen drei Untersuchungen wiesen Wildtypmäuse eine deutlich höhere Mortalität auf als TLR3  $-/-$  Mäuse. Dieser unerwartete Befund ist unter Umständen auf die experimentelle Infektion mittels Injektion zurückzuführen, die sich von den natürlichen Infektionswegen unterscheidet. Auch die eingesetzte Virenmenge mag eine Rolle gespielt haben, so überlebte bei Wang et al. keine Wildtypmaus die Infektion mit West Nil Viren [58].

Im Menschen korreliert eine dominant-negative Mutation von TLR3 mit HSV-1 Enzephalitis in ansonsten gesunden Patienten. Fibroblasten aus TLR3 defizienten Individuen reagieren auf die Stimulation mit poly(I:C) nicht mit der Expression von Typ I IFN [59].

### 1.3.4 TLR3 in T Zellen

Über die Rolle von TLR3 in T Zellen sind in den vergangenen Jahren einige Forschungsergebnisse publiziert worden. Die vorliegende Doktorarbeit baut auf Daten aus unserer Arbeitsgruppe über die Bedeutung von TLR3 in humanen  $\gamma\delta$  T Zellen auf. Kostimulation von  $\gamma\delta$  T Zellen über TLR3 und den TZR führte zu verstärkter Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie verstärkter IFN- $\gamma$  Sekretion in Vergleich zu TZR stimulierten Zellen. Darüber hinaus verstärkt poly(I:C) die Proliferation der Zellen [27].

In humanen CD4 $^{+}$  T Zellen induziert poly(I:C) nach vorheriger Aktivierung der Zellen eine verstärkte Aktivität der MAP- und der Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) sowie des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die Expression von IL-21 und IL-17-A wird verstärkt, wobei IL17-A nur von CD4 $^{+}$  Gedächtniszellen produziert wird [60]. Ferner kommt es zu einer verstärkten Expression des anti-apoptischen Moleküls Bcl-xL und verringertem Zelltod von aktivierten murinen CD4 $^{+}$  T Zellen [61]. Eine erhöhte Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie der inhibitorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1 in ruhenden, nicht über den TZR aktivierten humanen CD4 $^{+}$  T Zellen wurde von Simone und Kollegen nach poly(I:C) Stimulation beobachtet. Allerdings wurden die eingesetzten Zellen durch Positivselektion mittels eines anti-CD4 Antikörpers isoliert, wodurch eine Voraktivierung der Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

## 2 FRAGESTELLUNG

Für die vollständige Aktivierung von T Zellen sind zwei Signale notwendig. Der TZR wird durch Bindung an den MHC-Peptid Komplex aktiviert und ein zweites kostimulatorisches Signal wird durch Bindung von CD28 auf der T Zelle an seinen Liganden auf APZ vermittelt. Neben diesen beiden Signalwegen sind zahlreiche weitere Rezeptor-Ligand Interaktionen bekannt, die die Aktivierung von T Zellen modulieren können, zum Beispiel die in der Einleitung angesprochene Interaktion von CTLA-4 oder PD-1 mit ihren Liganden.

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Kostimulation mit dem dsRNA Analog poly(I:C) die TZR vermittelte Aktivierung von  $\gamma\delta$  T Zellen signifikant verstärkte. Sowohl die Expression des Aktivierungsmarkers CD69, als auch Proliferation und Produktion von IFN- $\gamma$  wurden deutlich gesteigert. In diesem Zusammenhang konnte auch die Expression von TLR3 in  $\alpha\beta$  T Zellen nachgewiesen werden [27].

Aufbauend auf diesen Befunden sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die kostimulatorische Kapazität von poly(I:C) auf die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen näher charakterisiert werden.

Zielsetzung der Arbeit im Einzelnen:

- 1) Charakterisierung von TLR3 als Rezeptor für poly(I:C) in primären humanen CD4<sup>+</sup> T Zellen.
- 2) Analyse des Einflusses von poly(I:C) auf die CD4<sup>+</sup> T Zellaktivierung (u.a. Expression von Aktivierungsmarkern, Sezernierung von Chemo- und Zytokinen, Proliferation). Besondere Aufmerksamkeit wurde hierbei dem Vergleich der kostimulatorischen Kapazität von poly(I:C) mit dem „klassischen“, CD28 vermittelten T Zell Kostimulus gewidmet.
- 3) Detaillierte Analyse der zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege durch durchflusszytometrische, Protein-biochemische und molekularbiologische Methoden. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als einem der Schlüsselregulatoren des Immunsystems gelegt.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte

Geräte	Firma
Absaugvorrichtung Filter Mate Harvester	Perkin Elmer, Dreieich
Agarose-Gel-Dokumentationsanlage Gel Imager	Intas, Göttingen
Agarose-Gel-Kammer Mini-Sub™ Cell GT	Bio Rad, München
Agarose-Gel-Kammer Wide Mini-Sub™ Cell GT	Bio Rad
β-Szintillationszähler 1450 Microbeta	Inotech, Schweiz
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Forma Scientific, USA
Durchflußzytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflußzytometer BD FACSAarray™ bioanalyzer	BD Biosciences
Entwicklermaschine	Agfa, Gera
Gelelektrophorese-Kammer Protean® Xi Cell	Bio Rad
Gelelektrophorese-Kammer X Cell SureLock™	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Pulser	Bio Rad
Gene Pulser RF-Modul	Bio Rad
ICycler™ Real Time PCR Detektionssystem	Bio Rad
Kühlzentrifuge Biofuge 15R	Thermo Scientific, Osterode
LAS3000 (Image capturing unit)	Fujifilm, Düsseldorf
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss
Lichtmikroskop Axiovert 10	Zeiss
Luminometer FB12	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikroplatten-Photometer 'infinite™ M200'	Tecan, Crailsheim
Netzgerät Power Supply 250-2	Sigma Techware, München
Netzgerät Power Pack 200/300	Bio Rad
Neubauer-Zählkammer	Fischer, Frankfurt am Main
PCR Maschine T Gradient	Biometra, Göttingen
Spektrometer SmartSpec™3000	Bio Rad
Sterilbank Lamin air™	Thermo Scientific
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Western Blot Transfer-Kammer Trans-blot Cell	Bio Rad
Wipptisch Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau

#### 3.2 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Einfrierrohrchen CryoTube™	Thermo Scientific, Langenselbold
Elektroporationsküvetten (0,2 und 0,4 cm)	Bio Rad
Dynabeads™M-450 Epoxy	Invitrogen
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Hyperfilm™ ECL-Chemilumineszenz-Film	Amersham, Freiburg
MACS-LS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Mikrotiterplatte Maxisorb	Nunc
Nitrozellulose-Membran Hybond™ C Extra	Amersham
PCR-Röhrchen Multiply™ -µ Strip 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nürnberg

Material	Firma
PCR-Röhrchen Deckelkette	Sarstedt
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner
Pipetierhilfen (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Pipetierhilfe accu-jet™ pro	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Rundbodenplatte mit 96 Kavitäten	Nunc
Spitzbodenplatte mit 96 Kavitäten	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Zellkulturflaschen Cellstar (50, 250, 650 ml)	Greiner
Zellkulturplatten (12, 24, 96 Kavitäten)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner

### 3.3 Chemikalien und Medien

Standard-Laborchemikalien wurden von den Firmen Roth, Serva, Invitrogen, Merck und Biochrom AG bezogen.

Substanz	Firma
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE)	Fluka, Deisenhofen
DMEM ( <i>Dulbecco's minimum essential medium</i> )	PAA, Österreich
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Flagellin	Invivogen
Imiquimod	Invivogen, Frankreich
ImmoMix™/ImmoMix™ Red	Bioline
Ionomycin	Calbiochem, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Lymphozyten Separationsmedium	Biochrom AG
Methyl- <sup>3</sup> [H] Thymidin	Amersham
NuPAGE™ MES SDS-Laufpuffer (20X)	Invitrogen
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (10 well, 1.5 mm)	Invitrogen
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel (15 well, 1.5 mm)	Invitrogen
Pam3CSK4	Invivogen
Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma
Phytohämagglutinin (PHA)	Remel, Dartford, UK
polyinosinic-polycidylic acid (poly(I:C))	Calbiochem
poly(I:C) LyoVec	Invivogen
Random Primer	Invitrogen
rekombinater RNasin™ Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
Rinderserum-Albumin (BSA)	Roth
ROX Referenz Puffer	Bioline
ssPolyU	Invivogen
ssRNA40	Invivogen
SYBR™ Green Solution (50X)	Molecular Probes, Leiden, ND
TMB Substrat	Thermo Scientific
Zellkulturmedium RPMI1640	Invitrogen
Zellkulturmedium X-VIVO 15	Lonza, Belgien

### 3.4 Antikörper

#### 3.4.1 Antikörper für Stimulation der Zellen

Molekül	Klon	Einsatzkonzentration	Firma
CD3	OKT3	2 µg/ml	Janssen-Cilag, Neuss
CD28	CD28.2	1 µg/ml	BD Biosciences

#### 3.4.2 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen von Zelloberflächemolekülen

Molekül	Isotyp	Klon	Einsatzkonzentration	Firma
CD2	IgG2a	S5.2	2,5 µg/ml	BD Biosciences
CD3	IgG1	SK7	2,5 µg/ml	BD Biosciences
CD4	IgG1	SK3	0,6 µg/ml	BD Biosciences
CD8	IgG1	SK1	2,5 µg/ml	BD Biosciences
CD14	IgG1	MφP9	5 µg/ml	BD Biosciences
CD25	IgG1	SA3	1,25 µg/ml	BD Biosciences
CD28	IgG1	L293	12,5 µg/ml	BD Biosciences
CD56	IgG2b	NCAM16.2	1,2 µg/ml	BD Biosciences
CD69	IgG1	L78	0,6 µg/ml	BD Biosciences
CD95	IgG1	DX2	1:5	BD Biosciences
CD141	IgG1	AD5-14H12(1)	1 µg/ml	Miltenyi
CD152	IgG2a	BNI3	1:2	BD Biosciences
CD303	IgG1	AC144(1)	6 µg/ml	Miltenyi
PD-1	IgG1	EH12.2H7	1:2	Biolegend
TIM-3	IgG2a (Ratte)	344823	5 µg/ml	R&D, Wiesbaden
TLR3	IgG1	TLR3.7	10 µg/ml	eBioscience
TZR $\alpha\beta$	IgG2b	BMA031	1:2	Caltag
TZR $\gamma\delta$	IgG1	11F2	5 µg/ml	BD Biosciences
Isotypkontrollen				
IgG1		X40	5 – 10 µg/ml	BD Biosciences
IgG2a		X39	5 µg/ml	BD Biosciences

#### 3.4.3 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen von intrazellulären Molekülen

Molekül	Isotyp	Klon	Einsatzkonz.	Firma
Phosflow™-Antikörper				
P-Akt (pS473)	IgG1	M89-61	0,06 µg/ml	BD Biosciences
P-Akt (pT308)	IgG1	J1-223.371	0,06 µg/ml	BD Biosciences
P-p65 (pS529)	IgG2b	K10-895.12.50	1:5	BD Biosciences
P-ZAP70	IgG1	17a/P-ZAP70	1:5	BD Biosciences

Abkürzungen: P = phospho

### 3.4.4 Antikörper für Western Blot Analysen

Molekül	MGW(kDa)	.Spezies	Klon	Einsatzkonz.	Firma
β-Aktin	42	Maus	AC-15	1:10000	Sigma
P-Erk1/2	42/44	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Cell Signaling
IκB-α	39	Kaninchen	44D4	1:1000	Cell Signaling
P-IRF3	55	Kaninchen	4D4G	1:1000	Cell Signaling
P-p38	43	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Cell Signaling
P-p65	65	Kaninchen	93H1	1:1000	Cell Signaling
P-STAT1	84	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Cell Signaling
P-STAT3	86	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Cell Signaling
TLR3	104	Maus	40C1285.6	2 µg/ml	Alexis

Abkürzungen: P = phospho

Für Antikörper, bei denen die Ausgangskonzentration unbekannt war, wurde die eingesetzte Verdünnung angegeben.

### 3.5 Inhibitoren

Substanz	Firma
Aprotinin	Sigma
Celastrol	Invivogen
Colchicin	Sigma
ConcanamycinA	Sigma
GM6001 (Ilomastat, Galardin, 5 µg/ml)	Calbiochem
Leupeptin	Sigma
Monensin	Calbiochem
Monodansylcadaverin (MDC, 0,05 mM)	Sigma
Natriumorthovanadat	Merck
Natriumfluorid	Fluka
Natriumpyrophosphat	Sigma
PD98059	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma
SB202190	Sigma
SB203580	Sigma
Wortmannin	AppliChem (Darmstadt)

### 3.6 Enzyme

Enzym	Firma
Restriktionsenzyme	
BamH1	NEB
EcoRI	NEB
HindIII	NEB

Enzym	Firma
Sall	NEB
Weitere Enzyme M-MLV Reverse Transkriptase	Promega

### 3.7 Kits

Kit	Firma
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg Kit	Dynal
Cytofix Puffer	BD Biosciences
Phosflow Cytoperm III	BD Biosciences
Cytofix/Cytoperm Kit	BD Biosciences
DyeEx™2.0 Spin Kit	Qiagen
ECL- Detektionskit	GE-Healthcare, München
HotStarTaq™ DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Kompetente Bakterien (One Shot™ TOP10 E.coli)	Invitrogen
MACS CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II™	Miltenyi
NucleoSpin™ RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin™ Plasmid Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond™ PC500	Macherey-Nagel
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA cloning kit	Invitrogen
BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kits	Applied Biosystems
Luciferase Assay System	Promega
ELISA-Kits	
Human Granzyme B ELISA	BenderMed Systems, Wien
Human IFN- $\alpha$ Elisa kit	PBL Interferon Source Piscataway, USA
Human IFN- $\beta$ Elisa kit	PBL Interferon Source,
Human IFN- $\gamma$ DuoSet	R&D Systems, Wiesbaden
Human IL-2 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
Human TNF- $\alpha$ Duo-Set	R&D Systems
Cytometric Bead Array (CBA)	
Human IFN- $\gamma$ CBA Flex Set	BD Biosciences
Human IL-2 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human IL-4 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human IL-6 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human IL-8 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human IL-10 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human IP-10 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human MCP-1 CBA Flex Set	BD Biosciences
Human MIP1- $\alpha$ CBA Flex Set	BD Biosciences
Human MIP1- $\beta$ CBA Flex Set	BD Biosciences
Human RANTES CBA Flex Set	BD Biosciences
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Biosciences
Human TNF CBA Flex Set	BD Biosciences

### 3.8 Puffer und Lösungen

#### 3.8.1 Puffer und Lösungen für Protein Biochemie

Puffer/Lösung	Substanz	Menge
Laufgel (Bio Rad, 10%-ig)	Acrylamid/Bisacrylamid	33% (v/v)
	Tris-Puffer 1M, pH 8,8	36% (v/v)
	SDS 10%	1% (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	2,87% (v/v)
	APS 20%	0,33% (v/v)
	TEMED	0,066% (v/v)
Sammelgel (Bio Rad)	Acrylamid/Bisacrylamid	16,7% (v/v)
	Tris-Puffer 1M, pH 6,8	12,5 % (v/v)
	SDS 10%	1% (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	7,03% (v/v)
	APS 20%	0,5% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
Elektrophoresepuffer (Bio Rad, 10X)	Tris	3,03% (w/v)
	Glycin	14,4% (w/v)
	SDS	1% (w/v)
	ddH <sub>2</sub> O	add Vol.
Elektrophoresepuffer (NuPAGE)	NuPAGE™ MES-Puffer	5% (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	add. Vol.
Probenpuffer (Bio Rad)	SDS	6% (w/v)
	Glycerin	30% (v/v)
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM
	Bromphenolblau	0,005% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	2-5% (v/v)
Probenpuffer (NuPAGE)	Probe	x µl
	NuPAGE™ LDS-Puffer (4X)	2,5 µl
	DTT (10X)	1 µl
	ddH <sub>2</sub> O	auf 6,5 µl
Western-Blot-Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS (10 %)	0,015% (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	auf 4 l
Tris buffered saline (TBS)	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	
Tris buffered saline-Tween (TBS-T)	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	



Puffer/Lösung	Substanz	Menge
	Tween 20	0,05% (v/v)
Milchpulver-Blockierungslösung	Tris NaCl auf pH 7,5-8,0 einstellen Tween 20 Magermilchpulver	10 mM 150 mM  0,05% (v/v) 5% (w/v)
BSA-Blockierungslösung	Tris NaCl auf pH 7,5-8,0 einstellen 10% NaN <sub>3</sub> BSA	10 mM 150 mM  1% (v/v) 5% (w/v)
"Stripping"-Lösung	Tris pH 6,8 β-Mercaptoethanol 10% SDS ddH <sub>2</sub> O	62,5 mM 100 mM 2% (v/v) auf 500 ml

### 3.8.2 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Puffer/Lösung	Substanz	Menge
50X TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer)	Tris Eisessig 0,5 M EDTA, pH 8 ddH <sub>2</sub> O	24,2% (w/v) 5,71% (v/v) 10% (v/v) auf 1l
2% Agarose-Gel	Agarose 1X TAE-Puffer	2% (w/v) 50-200 ml
DNA-Auftragspuffer	Bromphenolblau Glycerin in ddH <sub>2</sub> O	0,25% (w/v) 30% (v/v)
LB-Medium	Pepton Hefe-Extrakt NaCl autoklavieren Ampicillin ddH <sub>2</sub> O autoklavieren, Lagerung bei 4°C	1% (w/v) 0,5% (w/v) 0,025% (w/v)  50 µg/ml auf 1 l
LB-Agar	LB-Medium Agar-Agar autoklavieren, 20 ml Agar/Platte, Lagerung: 4°C	1 l 20 g

Puffer/Lösung	Substanz	Menge
	Ampicillin	100 µg/ml
	Bei Bedarf : X-Gal (40 mg/ml):	40 µl/Platte
SOC-Medium	Pepton	2% (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	0,05% (w/v)
	KCl	0,25% (w/v)
	pH auf 7,0 einstellen, mit Wasser auffüllen und autoklavieren	auf 485ml
	Glucose 1 M	2% v/v
	MgCl <sub>2</sub> 1 M	1% v/v

### 3.8.3 Puffer und Lösungen für die Zellbiologie

Puffer/Lösung	Substanz	Menge
MACS-Waschpuffer (M-WP)	BSA	5% (w/v)
	EDTA	2 mM
	PBS	auf 0,5-1l
Lysepuffer für Zellen	NP-40	1% (v/v)
	Tris pH 7,4	20 mM
	NaCl	0,15 M
	EDTA	5 mM
	Aprotinin	2 µg/ml
	Leupeptin	2 µg/ml
	PMSF	1 mM
	Natriumorthovanadat	1 mM
	Natriumfluorid	10 mM
	Natriumpyrophosphat	1 mM
	Pepstatin A	2 µg/ml
FACS-Waschpuffer (F-WP)	BSA	1% (w/v)
	NaN <sub>3</sub>	0,1% (w/v)
	PBS	ad. Vol.
FACS-Fixierlösung	PBS	
	PFA	0,1 % (w/v)
Einfriermedium	FKS	20% (v/v)
	DMSO	10% (v/v)
	RPMI Medium	ad. Vol.

### 3.9 Primer für qRT-PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealingtemperatur(°C)
A20-F	TGCACACTGTGTTTCATCGAG	60
A20-R	ACGCTGTGGGACTGACTTTC	60
BCL2L1-F	GCTGAGTTACCGGCATCC	58
BCL2L1-R	CTGAAGGGAGAGAAAGAGATTCA	58
CSF2-F	TCTCAGAAATGTTTGACCTCCA	60
CSF2-R	GCCCTTGAGCTTGGTGAG	60
G6PDH-F	ACAGAGTGAGCCCTTCTTCAA	60
G6PDH-R	ATAGGAGTTGCGGGCAAA	60
GATA3-F	CTCATTAAGCCCAAGCGAAG	60
GATA3-R	TCTGACAGTTCGCACAGGAC	60
HuPo-F	TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT	60
HuPo-R	CAATCTGCAGACAGACACTGG	60
Icam1-F	CCTTCCTCACCGTGTACTGG	62
Icam1-R	AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC	62
IFN- $\alpha$ -F	TGARAAATACTTCAAGAATCA	57
IFN- $\alpha$ -R	GATTTCTGCTCTGACAACCTCC	57
IFN- $\beta$ -F	GGCTGGAATGAGACTATTGTTGA	58
IFN- $\beta$ -R	CAGGACTGTCTTCAGATGGTTTATC	58
IRF7-F	AGCTGTGCTGGCGAGAAG	62
IRF7-R	TGTGTGTGCCAGGAATGG	62
T-bet-F	TGTGGTCCAAGTTTAATCAGCA	60
T-bet-R	TGACAGGAATGGGAACATCC	60
TLR3-F	AGTTGTCATCGAATCAAATTAAAGAG	56
TLR3-R	AATCTTCCAATTGCGTGAAAA	56

Abkürzungen: F = forward; R = reverse

### 3.10 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	ATCC Nomenklatur	Zellpopulation
Jurkat	JE6.1	T Lymphozyten
HEK293T	293T	embryonale Nierenzellen

## 4 Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde die gewünschte Zellzahl durch 5 minütige Zentrifugation bei 1400 Upm sedimentiert. In 1 ml Einfriermedium konnten  $5\text{--}30 \times 10^6$  Zellen aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt werden. Die Einfrierröhrchen wurden in Isolierfolie verpackt und für 2-4 Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Daraufhin wurden die Zellen auf  $-80^\circ\text{C}$  überführt. Bei dieser Temperatur wurden sie über Nacht gelagert. Anschließend konnten die Zellen zügig in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Der Auftauprozeß erfolgte in 14 ml RPMI Medium mit 10 % FKS. Die aufgetauten Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation 1400 Upm sedimentiert, erneut gewaschen und über Nacht in RPMI Medium mit 10% FKS im Brutschrank kultiviert.

#### 4.1.2 Kultivierung von Jurkat Zellen

Bei Jurkat Zellen handelt es sich um immortalisierte Zellen eines T Zelllymphoms.

Jurkat Zellen wurden in einer Zelldichte von  $0,5 - 1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-Medium mit 5% FKS im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Für den Einsatz in Versuchen wurden die Zellen am Vortag auf eine Zelldichte von  $0,6 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt.

#### 4.1.3 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Lymphozytenkonzentrate („buffy coats“, LRS) gesunder Spender wurde von dem Institut für Transfusionsmedizin des Uniklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt. Die Isolation mononukleärer Zellen aus dem Blut (PBMZ) erfolgte mittels Ficoll-Hypaque Dichte-Gradienten Zentrifugation. Die mononukleären Zellen, Lymphozyten und Monozyten, konzentrierten sich an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Überstand. Der Überstand setzte sich aus PBS und Plasma zusammen und enthielt Thrombozyten, die eine geringere

Dichte als Lymphozyten und Monozyten aufwiesen. Zellen mit höherer Dichte, Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen wurden pelletiert.

In 250 ml Zellkulturflaschen wurden 100ml PBS vorgelegt und das Blut (ca. 50 ml) dazugegeben und gründlich resuspendiert. In 50 ml Zentrifugationsröhrchen wurden 15 ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml Blut-PBS Gemisch überschichtet. Die Dichte-Gradienten Zentrifugation erfolgte bei 2000 Upm für 20 Minuten.

Die am Interphasering ankonzentrierten Zellen wurden vorsichtig abgenommen und in ein frisches 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Das Volumen wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, die Zellen gründlich resuspendiert und durch 5 minütige Zentrifugation bei 1600 Upm pelletiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS (1000 Upm, 10 Minuten) um Ficollrückstände und Thrombozyten vollständig zu entfernen. Die isolierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in RPMI Medium mit 10% FKS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

### 4.1.4 Magnetische Isolation von CD4<sup>+</sup> T Zellpopulationen

Zur Isolation von CD4<sup>+</sup> T Zellen aus PBMZ wurden Materialien der Firma Miltenyi (CD4<sup>+</sup> negativ isolation kit II) verwendet. Die Isolation beruht auf der Markierung aller unerwünschten Zellpopulationen innerhalb der PBMZ anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle. An diese Oberflächenmoleküle ließ man Biotin-gekoppelte Antikörper binden. An die Biotin Markierung wiederum wurden Streptavidin-gekoppelte paramagnetische Partikel gebunden, sodass die markierten Zellen in einem magnetischen Feld zurück gehalten werden konnten und lediglich die unmarkierten CD4<sup>+</sup> T Zellen eluiert wurden.

Aus dieser Zellpopulation wurden für einige Versuche mit Hilfe des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Kit der Firma Dynal noch CD25 exprimierende CD4<sup>+</sup> T Zellen entfernt. CD25 ist die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors und wird konstitutiv von regulatorischen T Zellen (Treg) exprimiert.

CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden aus PBMZ isoliert.  $100 \times 10^6$  PBMZ wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 1400 Upm sedimentiert und zweimal mit 10 ml MACS Waschpuffer (M-WP) gewaschen. Die Zellen wurden in 400  $\mu$ l M-WP aufgenommen und nach Zugabe von 100  $\mu$ l Biotin gekoppeltem Antikörper Cocktail für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 300  $\mu$ l M-WP und 200  $\mu$ l paramagnetische Partikel zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dem Ansatz wurden 10 ml M-WP zugesetzt und die Zellen mit den daran gebundenen Komplexen aus Antikörpern und paramagnetischen Partikeln wurden durch 7 minütige Zentrifugation bei 1300 Upm sedimentiert und in 500  $\mu$ l M-WP

aufgenommen. Die Trennsäulen wurden einem Magnetfeld ausgesetzt und durch dreimaliges Spülen mit 1 ml M-WP equilibriert. Die markierten PBMZs wurden auf die Säule gegeben und diese mit 3x 1 ml M-WP gespült. Der Durchfluss, der die unmarkierten CD4<sup>+</sup> T Zellen enthielt, wurde aufgefangen. Um die Reinheit der isolierten Zellpopulation zu erhöhen wurden die Zellen anschließend über eine weitere, frisch equilibrierte Trennsäule gegeben. Die isolierten CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 1400 Upm sedimentiert, in 10 ml X-VIVO Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Effizienz der Isolation wurde routinemäßig durch durchflusszytometrische Analysen kontrolliert.

### 4.1.5 Stimulation von Zellen

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde überwiegend mit primären CD4<sup>+</sup> T Zellen gearbeitet. Im größten Teil der aufgeführten Experimente wurden diese Zellen in unterschiedlichen Kombinationen über den TZR, TLR3 und gegebenenfalls über das kostimulatorische Molekül CD28 stimuliert. Der TZR Signalweg wurde durch Quervernetzung von CD3 unter Verwendung monoklonaler Antikörper (mAk) aktiviert. CD28 Kostimulation erfolgte ebenfalls durch Verwendung eines agonistischen Antikörpers. TLR3 wurde mittels des synthetischen Liganden poly(I:C) stimuliert. Alle Stimulationen von primären CD4<sup>+</sup> T Zellen erfolgten bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$ /ml in X-VIVO Medium. Jurkat Zellen wurden mit einer Dichte von  $0,5 \times 10^6$  /ml in RPMI-Medium mit 5 % FKS stimuliert.

#### 4.1.5.1 TLR3 Stimulation

Die Stimulation der T Zellen über TLR3 erfolgte entweder parallel zu der Stimulation des TZR, alternativ wurden die Zellen mit poly(I:C) vorinkubiert und anschließend über den TZR stimuliert. Die Endkonzentration von poly(I:C) betrug, sofern nicht anders angegeben, in beiden Fällen 50 µg/ml. Für die Vorinkubation mit poly(I:C) wurden die CD4<sup>+</sup> T Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit poly(I:C) für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert. Parallel wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen unter den gleichen Bedingungen ohne poly(I:C) kultiviert. Nach der Präinkubation wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1400 Upm sedimentiert, zweimal in PBS gewaschen und anschließend für Versuche verwendet.

#### 4.1.5.2 TZR- und CD28 Stimulation

Abhängig von der Stimulationsdauer wurde der anti-CD3 mAk OKT3 in plattengebundener oder in löslicher Form eingesetzt, löslich bei Kurzzeitstimulationen (1 Minute bis 3 Stunden), plattengebunden bei Langzeitstimulationen (4 Stunden bis 5 Tage).

Bei der Stimulation mit plattengebundenem mAk wurden 2 µg/ml OKT3 in PBS verdünnt, Kavitäten der verwendeten Zellkulturplatten damit beschickt und für 2 ½ Stunden im Brutschrank inkubiert. Bei Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten wurde hierfür ein Volumen von 1,5 ml, mit 24 Kavitäten 250 µl und mit 96 Kavitäten 100 µl PBS-OKT3 verwendet. Nach der Inkubation wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen.

Der agonistische anti-CD28 mAk wurde, soweit nicht anders angegeben, in löslicher Form mit einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

Die Stimulation der T Zellen erfolgte im Brutschrank und wurde durch Entnahme und überführen auf Eis abgestoppt.

Bei der alternativen Variante für Kurzzeitstimulationen wurden primäre CD4<sup>+</sup> T Zellen in einer Dichte von 1x10<sup>6</sup>/ml und einem maximalen Volumen von 500 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß stimuliert. Im Falle der Präinkubation mit poly(I:C) wurden die Zellen nicht vor der TZR Stimulation gewaschen, sondern direkt nach Ende der 20-stündigen Inkubation mit mAk gegen CD3 und CD28 stimuliert. Für die Stimulation wurden die CD4<sup>+</sup> T Zellen auf Eis überführt und ein geringes Volumen (maximal 8 µl) X-VIVO Medium mit dem agonistischem anti-CD28 mAk und/oder anti-CD3 mAk OKT3 zugegeben, sodass die Endkonzentration erreicht wurde. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen sedimentiert und einmal in 500 µl eiskaltem X-VIVO Medium gewaschen. Die Stimulation erfolgte über Quervernetzung der an CD3 bzw. CD28 gebundenen mAk mittels Zugabe von 10 µg/ml Rabbit-anti-Mouse (RαM)-Antikörper in vorgewärmten (37°C) X-VIVO Medium. Das Volumen wurde dabei so gewählt, dass die Zelldichte 1x 10<sup>6</sup>/ml betrug. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und die Stimulation durch Zugabe von 1 ml eiskaltem PBS sowie Überführung auf Eis abgestoppt. Wurden die Zellen für Phosflow™ Analysen (siehe 4.1.6.3) verwendet erfolgte das Ende der Stimulation durch Zugabe von einem Volumen Cytifix Puffer.

#### 4.1.5.3 Phytohämagglutinin (PHA)-Stimulation

PHA ist ein Lektin, das glykosylierte Proteine auf der Zelloberfläche quervernetzt und somit zur polyklonalen Aktivierung von T- Zellen führt. Das Mitogen PHA induziert die Transkription

zahlreicher immunologisch relevanter Gene, sodass sich die cDNA gut für die Amplifizierung und Klonierung von Zielgenen für die qRT-PCR eignet.

Zur Herstellung von PHA-T Zellblasten wurden frisch isolierte PBMZ in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit PHA (0,5 µg/ml) stimuliert und in RPMI-Medium mit 10% FKS (v/v) kultiviert. Nach 3-5 Tagen wurden die toten Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation entfernt und die lebenden Zellen zum Entfernen des Ficolls dreimal mit RPMI-Medium mit 10% FKS gewaschen.

### 4.1.6 Durchflusszytometrische Analyse

Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich eine große Anzahl von Zellen in Suspension zu analysieren. Die zu untersuchenden Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen und unter Druck einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Das Licht wird dabei von der Zelle abgelenkt. So streuen granuläre Zellen das Licht stärker als nichtgranuläre Zellen, das Seitwärtsstreulicht (SSC) ist somit ein Maß für die Granularität der Zellen. Auch die Größe der Zellen hat einen Einfluss auf die Lichtstreuung. Über das Vorwärtsstreulicht (FSC) können Zellen unterschiedlicher Größe differenziert werden, da kleine Zellen weniger Licht streuen als große. Verschiedene Zellpopulationen des Blutes können allein anhand dieser Parameter recht gut differenziert werden.

Durch Markierung der Zellen mittels Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. über fluoreszenzmarkierte Antikörper, können die Analysemöglichkeiten beträchtlich erweitert werden.

#### 4.1.6.1 Detektion von Zelloberflächenmolekülen

Zur Analyse der Expression von Zelloberflächenmolekülen werden diese mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Um falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbindung auszuschließen, werden die Zellen parallel mit Antikörpern (Isotypkontrolle) inkubiert, die die gleiche Fluorochrommarkierung und den gleichen Isotyp wie der Analyse-Antikörper aufweisen, aber kein Epitop der Zelle erkennen.

Es wurden  $1-3 \times 10^5$  Zellen in eine 96 Kavitäten-Mikrotiterplatte gegeben und durch 4-minütige Zentrifugation bei 1000 Upm sedimentiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem FACS-Waschpuffer (F-WP) gewaschen. 5-10 µl der Fluorochrom konjugierten Antikörper wurden zugegeben und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die so behandelten



Zellen wurden noch zweimal mit 100 µl F-WP gewaschen. Wurden die Zellen sofort am Durchflusszytometer analysiert konnten sie in F-WP aufgenommen werden, bei späterer Analyse empfahl sich die Fixierung in 1% PFA.

Sollten Oberflächenmoleküle markiert werden, für die lediglich unkonjugierte Antikörper zu Verfügung standen, so war nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper noch ein weiterer Inkubationsschritt mit einem Fluorochrom konjugiertem Sekundärantikörper nötig.

### 4.1.6.2 Durchflusszytometrische Analyse von intrazellulären Proteinen

Die Markierung von intrazellulär lokalisierten Proteinen unterscheidet sich prinzipiell nicht von der Markierung auf der Zelloberfläche exprimierter Proteine. Vor der Inkubation mit den Fluorochrom konjugierten Antikörpern müssen die Zellen lediglich permeabilisiert und fixiert werden, um das Zelllumen zugänglich zu machen.

Für die intrazelluläre Antikörpermarkierung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in eine Spitzbodenmikrotiterplatte mit 96 Kavitäten gegeben, abzentrifugiert (1000 Upm, 4 Minuten) und zweimal mit 100 µl eiskaltem Staining Puffer gewaschen. Die Permeabilisierung und Fixierung erfolgte durch Zugabe von 100 µl Cytofix/Cytoperm (BD) und 20-minütiger Inkubation bei 4°C. Vor der Antikörpermarkierung wurden die Zellen zweimal mit 200 µl Perm/Wash (BD) gewaschen. Die entsprechenden Fluorochrom konjugierten Antikörper wurde in 100 µl Perm/Wash verdünnt, zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschrissen konnten die Zellen in 100 µl Perm/Wash aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert werden.

Für die Markierung von intrazellulär gespeicherten Zytokinen wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen 3 Stunden vor Beginn der Markierungsprozedur mit 2µM Monensin inkubiert. Monensin inhibiert die Exozytose, sodass die während der Inkubationszeit exprimierten Zytokine nicht ausgeschüttet werden konnten und sich durch Antikörpermarkierung im Innern der CD4<sup>+</sup> T Zelle nachweisen ließen.

### 4.1.6.3 Analyse von Signalmolekülen mittels Phosflow™

Bei dieser Methode werden die stimulierten Zellen erst fixiert, dann permeabilisiert und mit einem Antikörper inkubiert, der die phosphorylierte Form eines Signalmoleküls erkennt. Im Vergleich zu anderen durchflusszytometrischen Methoden ist noch mehr darauf zu achten, dass die Zellen möglichst schonend und bei jedem Versuch möglichst gleich behandelt

werden, da auch schon geringe Abweichungen ein verändertes Phosphorylierungsprofil zur Folge haben können. Auch sollte nach der Antikörpermarkierung die durchflusszytometrische Analyse möglichst rasch erfolgen, da kleine Moleküle aus den permeabilisierten Zellen heraus diffundieren können.

Es wurden pro Färbung erneut  $1 \times 10^5$ – $3 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Nach beendeter Stimulation wurden die Zellen durch 10 minütige Inkubation mit einem Volumen Cytofix fixiert. Nach 30 sekundiger Zentrifugation bei 10000 Upm wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 100  $\mu$ l eiskaltem Cytoperm Puffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Permeabilisierungspuffer und die Rückstände des Fixierungspuffers wurden durch zweimaliges waschen mit 150  $\mu$ l Staining Puffer entfernt und 25  $\mu$ l der Antikörperlösung wurden zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln gefolgt von einem erneuten Waschschrift, wurden die Zellen in 100 $\mu$ l Stainingpuffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

#### 4.1.6.4 Zelltodanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung

Mittels Propidiumjodid (PI)-Färbung ist es möglich den Anteil toter Zellen durchflusszytometrisch zu bestimmen. Nach Auslösung des Zelltods kommt es zu der Desintegration der Plasmamembran wonach das PI in die toten Zellen diffundieren kann und in die DNA interkaliert. Das interkalierte PI fluoresziert ca. 20-30 mal stärker als ungebundenes und kann so durchflusszytometrisch erfasst werden.

Die zu analysierenden  $CD4^+$  T Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (1400 Upm, 5 min) und in 100  $\mu$ l PI-Lösung (2,5  $\mu$ g/ml PI in PBS) aufgenommen. Die Messung am Durchflußzytometer erfolgte nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln und sollte innerhalb von 45 Minuten abgeschlossen sein.

#### 4.1.6.5 Proliferationsanalyse mittels CFSE-Markierung

CFSE ist die deacetylierte Form von CFDA-SE. CFDA-SE ist zellpermeabel und nicht fluoreszent. Im Zytoplasma der Zellen werden durch zytosolische Esterasen die Acetatgruppen des CFDA-SE entfernt. Der entstandene Ester CFSE ist fluoreszent. Die Succinimidyl-Ester-Gruppen des CFSEs reagieren mit Aminen der intrazellulären Moleküle, wodurch CFSE seine Zellpermeabilität verliert. Bei jeder Zellteilung wird CFSE paritätisch an

beide Tochterzellen weitergegeben, die nun eine geringere Fluoreszenzintensität aufweisen als die Progenitorzelle.

Die mit CFSE zu markierenden  $CD4^+$  T Zellen wurden mit PBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$ /ml eingestellt und mit dem gleichen Volumen 10  $\mu$ M CFDA-SE in PBS gemischt, sodass sich eine Endkonzentration von 5  $\mu$ M ergab. Nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C wurden 5-10 ml eiskaltes X-VIVO Medium zugesetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die  $CD4^+$  T Zellen wurden durch Zentrifugation für 7 Minuten bei 1600 Upm pelletiert, dreimal mit Medium gewaschen, in X-VIVO Medium aufgenommen und stimuliert.

Nach beendeter Stimulation wurden die  $CD4^+$  T Zellen einmal mit 100  $\mu$ l kaltem F-WP gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Da der Fluoreszenzfarbstoff sehr lichtempfindlich ist, erfolgten sowohl die Markierung als auch alle weiteren Arbeitsschritte soweit möglich unter Lichtausschluss.

### 4.1.7 Proliferationsanalyse mittels $^3\text{H}$ Thymidin-Einbau

Bei dieser Methode wird die Proliferation von Zellen über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin (Methyl- $^3\text{H}$  Thymidin) in die DNA quantifiziert. Die Methyl- $^3\text{H}$  Thymidin Inkorporation ist direkt proportional zu der im Markierungszeitraum erfolgten DNA Synthese und damit zur Proliferation der Zellen.

Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 200  $\mu$ l in jeweils einer Kavität einer 96-Kavitäten Rundboden Platte mit zu untersuchenden Stimuli inkubiert. Um die Signifikanz der Daten zu gewährleisten und gegeben falls Abweichungen identifizieren zu können, wurden jeweils Triplikate angesetzt. 16 Stunden vor Ende der Kultur, wurden pro Kavität 1  $\mu\text{Ci } ^3\text{H}$  Thymidin (20  $\mu$ l 10Ci  $^3\text{H}$  Thymidin/ml Medium) in RPMI-Medium ohne FKS zugegeben. Nach 16 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Mikrotiterplatten bei -20°C eingefroren.

Zur Analyse wurden die Mikrotiterplatten aufgetaut und auf Filtermatten überführt, die anschließend bei 90°C getrocknet wurden. Um die Radioaktivität der Proben messen zu können, wurden diese mit flüssigem Wachs überschichtet. Das Wachs diente als Szintillator der die radioaktive Strahlung der Proben in Lichtenergie umsetzt und so eine Quantifizierung in einem  $\beta$ -Szintillationszähler ermöglicht.

#### 4.1.8 Analyse von Zellkulturüberständen

##### 4.1.8.1 ELISA

Mit Hilfe eines Sandwich ELISAs wurden im Rahmen der Doktorarbeit Proteine nachgewiesen, die von  $CD4^+$  T Zellen sezerniert, bzw. von der Zelloberfläche abgespalten wurden. Die zu analysierenden Zellüberstände wurden dabei auf Mikrotiterplatten gegeben, die mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu untersuchende Protein beschichtet waren. War das Protein an diesen ersten Antikörper gebunden, wurde ein zweiter Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop des gleichen Proteins erkannte. Der zweite Antikörper war entweder direkt an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt oder die Kopplung erfolgte während des Versuchs. Das Enzym katalysierte die Umsetzung von Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid, wodurch es zu einem Farbumschlag kam. Die Intensität der Färbung war direkt proportional zu der Konzentration des zu untersuchenden Proteins im Überstand.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden  $IFN-\gamma$ ,  $IFN-\beta$ ,  $TNF-\alpha$ , IL-2, IL-4, und Granzym B ELISAs durchgeführt. In allen Fällen wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Für die Analyse von  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  und IL-2 wurden die Überstände 1:2 in X-VIVO Medium verdünnt, für Granzym B wurde eine 1:20 Verdünnung gewählt.

##### 4.1.8.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA dient der gleichzeitigen Analyse verschiedener löslicher Faktoren im Überstand und ermöglicht auch bei nur geringem Probenvolumen die Konzentrationsbestimmung zahlreicher Zytokine und Chemokine. Hierfür werden die zu analysierenden Überstände mit verschiedenen Partikeln von diskreter Größe und Fluoreszenzintensität gemischt. Die Partikel sind jeweils mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Substanzen im Überstand beschichtet (Capture beads). Nach Inkubation der Partikel mit den Überständen werden fluoreszenzmarkierte Antikörper zugegeben, die wiederum die gebundenen Analyte erkennen. Durch Größe und Fluoreszenz der Partikel ist es möglich die verschiedenen Partikelpopulationen auseinanderzuhalten und den verschiedenen Analyten zuzuordnen, die fluoreszenzmarkierten Antikörper erlauben die Quantifizierung der gebundenen Analyte. Im Rahmen der in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden mit Hilfe des CBA die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-8, IP-10, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES,  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  im Zellkulturüberstand untersucht.

Der CBA wurde in Rundbodenplatten mit 96 Kavitäten angesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde mit vom Hersteller zur Verfügung gestelltem Standard eine Verdünnungsreihe angesetzt. Abhängig von dem Analyt wurden unterschiedliche Konzentrationen der Standardwerte eingesetzt. Die Überstände für die Bestimmung der Konzentrationen von IP-10, MIP1- $\beta$  und IFN- $\gamma$  wurden 1:10 verdünnt, wogegen die Überstände für die Untersuchungen von IL-8, MIP1- $\alpha$ , RANTES und TNF- $\alpha$  unverdünnt eingesetzt wurden.

Die Versuchsdurchführung erfolgte strikt nach den Angaben des Herstellers, die Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von K. Marx am FACSArray™ Bioanalyzer (BD).

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden mittels quantitativer *real time* (qRT)-PCR die Transkription verschiedener Gene untersucht. Die hier beschriebenen molekularbiologischen Arbeiten dienen in diesem Zusammenhang der Erstellung von Kontrollsequenzen, die der Überprüfung der qRT-PCR dienen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative Genexpression in Relation zur Expression eines Referenzgens mittels qRT-PCR bestimmt.

### 4.2.1 RNA Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen lysiert, durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden RNasen inaktiviert. Das Lysat wurde mit 70% Ethanol versetzt, wodurch die Löslichkeit der hydrophilen Nukleinsäuren herabgesetzt wurde. Das so behandelte Lysat wurde auf Säulen gegeben, wobei die RNA an die Säulenmatrix gebunden wurde. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert.

Verwendet wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen). 2-5 x 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T Zellen pro Probe wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und sedimentiert (1400 Upm, 5 Minuten). Das Pellet wurde in 350  $\mu$ l Lyse Puffer (RLT-Puffer, Qiagen) und 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und konnte jetzt bei -80°C gelagert werden. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Lysat ca. 10 Minuten auf Eis und anschließend bei RT aufgetaut. 350  $\mu$ l 70% Ethanol wurden dazugegeben, das Lysat gründlich gemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mehrmals nach Angaben des Herstellers gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte durch

Zugabe von 30 µl RNase freiem Wasser und einer einminütigen Zentrifugation bei 10000 Upm. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop bestimmt. Die RNA konnte für zwei Monate bei -20°C gelagert werden, zügiges Umschreiben in cDNA wurde jedoch bevorzugt.

### 4.2.2 RNA-Fällung

War die Konzentration der RNA zu gering als dass sie zur RT-PCR (siehe 4.2.4) eingesetzt werden konnte, musste die RNA gefällt werden. Dazu wurde das Löslichkeitsprodukt der RNA-Lösung durch Zugabe von 1/20 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen 96% Ethanol sowie durch Lagerung über Nacht bei -20°C unterschritten. Bei 1400 Upm wurde die Suspension 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert und anschließend mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen (1400 Upm, 10 Minuten). Danach wurde die RNA in dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 4.2.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoDrop Spektrometers ermittelt. Dafür wurde 1 µl Probe aufgetragen und anhand der Absorption bei 260 nm die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet. Darüber hinaus erlaubte die Analyse des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm Aussagen über die Reinheit der DNA oder RNA.

### 4.2.4 cDNA Synthese

Die RNA wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase aus dem *moloney murinen leukemia virus* in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde 1 µg RNA in 12,5 µl RNase freiem Wasser aufgenommen, mit 1 µl Random Hexamers versetzt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Anlagerung der Primer wurden alle weiteren Komponenten für die RT-PCR in einem Mastermix dazugegeben. Pro Probe umfasste dieser 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl dNTPs, 0,5 µl RNasin und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase. Die Transkription erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Die Enzyme wurden durch einen finalen 5 minütigen Heizschritt bei 95°C inaktiviert.

## 4.2.5 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf einer PCR bei der nach jedem Elongationszyklus die Menge doppelsträngiger DNA mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs bestimmt wird. Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Je früher dies der Fall ist, desto mehr Ausgangsmatrize befand sich in der analysierten Probe, sodass Schlüsse auf die Ausgangsmenge (SQ, Starting Quantity) gezogen werden konnten. Die Ausgangsmenge wird dann auf die Expression eines Referenzgens bezogen, dessen Expression durch die zu untersuchenden Stimuli nicht beeinträchtigt wird. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden hierfür die Expression der Polymerase II (HuPo) und die Expression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) untersucht. Die Etablierung dieser Gene als Referenzgrößen erfolgte durch S. Beetz und I. Martens.

Die Primerpaare für das zu untersuchende Gen wurden unter Verwendung des *Universal Probe Library Assay Design Center*-Programms (Roche) erstellt. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor Verwendung wurden die Primer auf Eis aufgetaut und mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt. Die qRT-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 4.1: qRT-PCR Ansatz

Substanz	Volumen
cDNA	2 µl
2x ImmoMix/ImmoMix Red	10 µl
ROX Referenz Puffer	2 µl
SYBR Green	0,4 µl
Forward-Primer	1 µl
Reverse-Primer	1 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 µl
dH <sub>2</sub> O	3 µl

Tabelle 4.2: qRT-PCR Programm

	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
<b>Denaturierung/Aktivierung der Polymerase</b>	05:30	95	1
<b>Denaturierung</b>	00:15	95	40
<b>Annealing</b>	00:15	Primerspezifisch	40
<b>Elongation</b>	00:10	72	40
<b>Melting</b>	00:10	55 + 0,5 (bis 95)	80

Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse (Melting) durchgeführt. Dabei wurden die PCR-Produkte schrittweise um je 0,5°C erwärmt bis eine Temperatur von 95°C erreicht wurde. Nach Erreichen des Schmelzpunkts des Amplikons, wurde der Farbstoff SYBR-Green freigesetzt, was eine drastische Abnahme der Fluoreszenz zu Folge hatte. Zur Auswertung wurde die erste negative Ableitung  $-d(RFU)/dT$  der gemessenen Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Die Ableitung der Fluoreszenz wies zu der Temperatur, an der die DNA aufgeschmolzen wurde, ein Maximum auf. Wurde unter den gewählten Bedingungen (Primer, Temperatur) genau ein einheitliches Produkt amplifiziert, so wies der Graph genau ein Maximum auf. Wurden mehrere Produkte erstellt, d.h. die Primer waren in der Lage die Amplifikation verschiedener Sequenzen zu vermitteln, waren mehrere Maxima zu erkennen. Nur mit Primern die ausschließlich das eine gewünschte Produkt amplifizierten wurde weiter gearbeitet.

Bei jeder qRT-PCR wurde ein Mengenstandard mitgeführt. Dafür wurde die zu untersuchende Sequenz unter Verwendung der auch in der qRT-PCR eingesetzten Primer amplifiziert. cDNA aus PHA-Blasten diente hierbei als Matrize. Die DNA wurde kloniert, der Erfolg der Klonierung durch Sequenzierung untersucht. Das Plasmid wurde isoliert und eine Verdünnungsreihe angefertigt, die als Mengenstandard diente. Sowohl Standard als auch cDNA wurden jeweils als Dubletten angesetzt.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der ICycler™ iQ Software Version 3.0a der Firma BioRad. Die relative Expression des Zielgens wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Relative Expression} = \text{Kopienzahl (SQ) Zielgen} / \text{Kopienzahl (SQ) Kontrollgen}$$

### 4.2.6 Klonierung der zu untersuchenden Gene

Die für die Klonierung eines zu untersuchenden Gens verwendeten Primerpaare wurden unter Verwendung des *Universal Probe Library Assay Design Center*-Programms (Roche) erstellt. Die Annealing Temperatur der Primerpaare sollte dabei möglichst 60°C betragen und ein Intron umspannen, sodass später Verunreinigungen der cDNA mit genomischer DNA erkannt werden konnten. Als Matrize für die PCR diente bei diesem Ansatz cDNA aus PHA-Blasten. Zur Amplifizierung der cDNA wurde eine PCR wie folgt durchgeführt:



Tabelle 4.3: PCR Ansatz zur Synthese von cDNA

Substanz	Volumen
PHA-Blasten cDNA	2 µl (0,5 µg)
Hot Taq Star™	0,25 µl
Hot Taq Star Puffer™	10 µl
dNTP	1 µl
Forward-Primer	1 µl (100 µM)
Reverse-Primer	1 µl (100 µM)
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	9,25 µl

Tabelle 4.4: PCR Programm zur Synthese von cDNA

	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
<b>Denaturierung/Aktivierung der Polymerase</b>	10	95	1
<b>Denaturierung</b>	00:30	95	35
<b>Annealing</b>	00:15	Primerspezifisch	35
<b>Elongation</b>	00:10	72	35
<b>Finales Annealing</b>	3	Primerspezifisch	1
<b>Finale Elongation</b>	5	72	1

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegel Analyse kontrolliert.

Die amplifizierte DNA wurde mit dem TOPO-TA Cloning Sets (Invitrogen) kloniert. Die Taq Polymerase addiert 3'-Adenin Überhänge an die PCR Produkte. Der hier zum Einsatz kommende TOPO Vektor ist kovalent an Topoisomerase I gebunden und trägt 3'-Thymidin Überhänge, die mit den Überhängen des PCR-Produkts reagieren können. Die aus dem Vaccinia Virus stammende Topoisomerase spaltet das Phosphodiester-Rückgrat der DNA unter Bildung einer neuen Bindung zwischen dem 3' Phosphat des Vektors und eines Tyrosins der Topoisomerase I. Die in dieser Bindung gespeicherte Energie erlaubt die Insertion des PCR-Produkts ohne weitere enzymatische Unterstützung. Die Topoisomerase wird nach Ligation des PCR Produkts in den Vektor freigesetzt. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.5: Ligationsansatz:

PCR-Produkt:	4 µl
NaCl-Lsg:	1 µl
pCR™2.1-TOPO Vektor:	0,75 µl

Nach Zusammengabe der Komponenten wurde der Ansatz 90 Minuten auf Eis und anschließend 5 Minuten bei RT inkubiert und konnte anschließend direkt transformiert werden.

### 4.2.7 Transformation

Um den Vektor mit der klonierten DNA zu amplifizieren wurde dieser in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Oneshot™ TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen)) transformiert. Dafür wurden je 50 µl der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 3 µl des Ligationsansatzes vermischt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, wodurch die Plasmid DNA von den Zellen aufgenommen wurde. Die Zellen wurden sofort auf Eis überführt und es erfolgte die Zugabe von 250 µl, auf RT erwärmten SOC Mediums. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert währenddessen sich die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz ausprägen konnte. Danach wurden die Zellen auf Ampicillin enthaltene LB-Agar Platten unter Zugabe von 40 µl 2% 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) ausplattiert. Das Plasmid beinhaltet unter anderem das lac-Z Gen, das β-Galactosidase kodiert. β-Galactosidase katalysiert die Umsetzung von X-Gal in Galaktose und einen blauen wasserunlöslichen Farbstoff. Wurde ein PCR-Produkt in das Plasmid inkorporiert, so wurde der Leserahmen des lac-Z Gens unterbrochen, was sich in fehlender Blaufärbung der entsprechenden Kolonien äußerte.

### 4.2.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurde zur Kontrolle im kleinen Maßstab durchgeführt (NucleoSpin™ Plasmid Kit, Macherey und Nagel). Die Aufreinigung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab erfolgte als Maxiprep (NucleoBond™ PC500, Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben.

### 4.2.9 Restriktionsverdau

Durch den Restriktionsverdau wird DNA sequenzspezifisch gespalten. Die Schnittstellen sind in der Regel palindromisch. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme (BamHI,

EcoRI, HindIII, Sall) sind Restriktionsendonukleasen vom Typ II und generieren einen 5' Überhang.

Durch den Restriktionsverdau wurde vorläufig überprüft ob das gewünschte Insert in ein Plasmid inkorporiert wurde. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen ist in Unit (U) angegeben. Pro µg DNA wurden von den hier verwendeten Enzymen jeweils 1 U eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer versetzt, mit Wasser auf ein Endvolumen von 10µl aufgefüllt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Der Erfolg des Restriktionsverdaus wurde durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Waren die Ergebnisse positiv, so wurde das Plasmid sequenziert.

### 4.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Im elektrischen Feld wandert DNA aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen in Richtung der Anode, wobei kleinere Fragmente schneller durch das Agarosegel wandern als große. Die Auftrennung von DNA erfolgte abhängig von der Größe der zu analysierenden Fragmente mit 0,5-1,5%-igen Agarose-Gelen.

Die Agarose wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid versetzt und in eine geeignete Gelkammer gegeben.

Die DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen, 3,5 µl DNA-Molekulargewichtsstandard wurden ebenfalls aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 80 Volt, als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde mit der Agarose-Gel-Dokumentationsanlage „Gel Imager“ festgehalten.

### 4.2.11 Sequenzierung von DNA

Zur sicheren Beurteilung der klonierten PCR-Fragmente wurden diese mit Hilfe von Komponenten des BigDye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 4.6: PCR Ansatz für die DNA Sequenzierung:

Substanz	Volumen
<b>DNA</b>	1 µg
<b>Ready Mix™ (Applied Biosystems)</b>	4 µl
<b>Forward-Primer</b>	4 µl (100 µM)
<b>Reverse-Primer</b>	4 µl (100 µM)
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Ad 20 µl

Tabelle 4.7: PCR-Programm für die DNA Sequenzierung

	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Anzahl der Zyklen
<b>Denaturierung/Aktivierung der Polymerase</b>	3	96	1
<b>Denaturierung</b>	00:30	96	25
	00:15	50	25
	4	60	25

Die Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem DyeEx™2.0 Spin Kit. Hierfür wurden die Säulen des Kits für 3 Minuten bei 2700 Upm zentrifugiert, um den Lagerungspuffer zu entfernen. Daraufhin wurde die Sequenzierreaktion vorsichtig auf die Gelmatrix geladen ohne diese zu beschädigen und erneut für 3 Minuten bei 2700 Upm zentrifugiert. Die nicht inkorporierten Fluoreszenzmoleküle wurden bei diesem Zentrifugationsschritt in der Gelmatrix zurückgehalten, während sich die markierten DNA-Fragmente im Durchfluss befanden.

#### 4.2.12 Elektroporation von Jurkat Zellen

Durch Elektroporation wurden in der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Luciferase Reporterkonstrukte in Jurkat Zellen transfiziert.

Hierfür wurden Jurkat-Zellen einmal mit RPMI-Medium ohne FKS gewaschen und auf eine Zelldichte von  $10 \times 10^6/\text{ml}$  in RPMI ohne FKS eingestellt. 10 µg der zu transfizierenden DNA wurden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 200 µl der Zellsuspension dazugegeben. Das Gemisch wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in eine auf Eis vorgekühlte Küvette überführt.

Die Elektroporation erfolgte durch den Gene Pulser von Biorad. Die Einstellungen des zugehörigen RF-Moduls waren wie folgt:

Total Volts:	280 V
% Modulation:	100 %
Amplitude:	140
Frequenz:	40 kHz
Burst:	50 msec
noBurst:	1
Burstintervall:	0,1 sec

Nach der Elektroporation wurden die Zellen zügig in 10 ml RPMI mit 10% FKS überführt und im Brutschrank inkubiert.

### 4.2.13 Luciferase-Reportergen Analyse

Das Luciferase Reportergen-Konstrukt umfasst ein für Luciferase codierendes Gen dessen Promotor aus zahlreichen Bindestellen für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor besteht. Wird dieser Transkriptionsfaktor aktiviert, kommt es zur Expression der Luciferase. Die relative Menge der gebildeten Luciferase und somit die Aktivität des Transkriptionsfaktors lässt sich nach Lyse der Zellen und Zugabe von Luciferin bestimmen. In Anwesenheit von ATP und  $Mg^{2+}$  decarboxyliert Luciferase das Luciferin.

Nach der Elektroporation wurden die Jurkat Zellen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend für 24 Stunden mit den zu untersuchenden Agenzien stimuliert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen durch Zugabe von 30  $\mu$ l CCLR-Lysepuffer (Promega) und kurzem Mischen lysiert. Die Zellreste wurden durch 4-minütige Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C sedimentiert. 20  $\mu$ l des Überstands wurden mit 100  $\mu$ l auf Raumtemperatur (RT) vorgewärmten Luciferase Reagens (Promega) gemischt und sofort am Luminometer analysiert.

## 4.3 Westernblotanalysen

### 4.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die zu analysierenden  $CD4^+$  T Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1400 Upm sedimentiert und einmal mit PBS gewaschen. Die

Zellen wurden in 1% NP-40 Lysepuffer aufgenommen und für 20-60 Minuten auf Eis inkubiert. Dem Lysepuffer wurden die Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin, Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid, PepstatinA, Natriumorthovanadat, EDTA, Natriumfluorid und Natriumpyrophosphat zugesetzt um sowohl die Degradation, als auch die Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C für 10 Minuten wurden unlösliche Zellbestandteile sedimentiert und die sich im Überstand befindlichen löslichen Proteine konnten abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden. Das Lysat wurde in der Regel direkt weiter verarbeitet, konnte aber nach diesem Schritt auch bei -20°C gelagert werden.

### 4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels eines Bradford Tests photometrisch bestimmt. Der Test beruht auf der Komplexbildung von Coomassie Brilliantblau mit den basischen Seitenketten von Proteinen. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie von 470 nm zu 595 nm.

995 µl Coomassie Protein Assay Reagenz wurden mit 5 µl Lysat gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde im Spektrometer bestimmt und mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibrierungsgeraden die Konzentration errechnet. Die Kalibrierungsgerade wurde anhand einer Verdünnungsreihe mit Albumin in PBS erstellt.

### 4.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE wurden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine wurden hierfür mit Probenpuffer versetzt und erhitzt. Durch diesen Schritt wurden die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen, als positiver Nebeneffekt wurden auch Proteasen und Phosphatasen denaturiert, sodass die Lysate bei 4°C gelagert werden konnten. Das SDS lagert sich an hydrophobe Bereiche des Proteins an, wodurch es diese in einem denaturierten Zustand hält. Ferner wird die Ladung des Proteins durch die negativ geladenen Sulfatgruppen des SDS abgeschirmt.

Die für die SDS-PAGE verwendeten Gele setzten sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Die Proben wurden in Taschen innerhalb des Sammelgels geladen. Im Sammelgel wurden die Proteine ankonzentriert, sodass sie nahezu gleichzeitig in das Trenngel eintraten. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte im Trenngel. Das

polymerisierte Polyacrylamid bildet eine Maschenstruktur aus, die kleine Proteine schneller passieren können als große. Zur Analyse kleinerer Proteine wurde daher ein Gel mit höherem Polyacrylamidanteil und somit engeren Maschen verwendet, als zur Analyse größerer Gele. Die Migrationsgeschwindigkeit der Proteine konnte durch die angelegte Spannung reguliert werden. Die Proteine wurden entsprechend ihrer Molekularen Masse aufgetrennt, da ihre Eigenladung durch das SDS maskiert wurde und ihre Sekundärstruktur durch Denaturierung aufgebrochen wurde. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden das Protean II System der Firma BioRad und das NuPAGE System der Firma Invitrogen für die SDS-PAGE verwendet.

### 4.3.3.1 SDS-PAGE mit dem Protean II System von BioRad

Bei dieser Methode wurden 10-50 µg Protein bzw. das Lysat von  $1-3 \times 10^6$  Zellen mit ½ Volumen 3x Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Der Probenpuffer enthält neben SDS β-Mercaptoethanol, wodurch Disulfidbindungen reduziert und so gespalten werden. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels betrug, je nach Größe des zu analysierenden Proteins, 10-15%. Das Trenngel wurde zuerst gegossen und mit 96% Ethanol überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. War das Trenngel auspolymerisiert wurde der Alkohol abgegossen und die Geloberfläche mit Wasser gespült. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen, wobei darauf zu achten war, dass sich zwischen Gel und Kamm keine Luftblasen befanden. Die Polymerisation erfolgte bei RT. Das Gel wurde in das Protean II System eingespannt und mit Elektrophorese Laufpuffer überschichtet. Nachdem die Proben aufgetragen worden waren, erfolgte nach einem 10-30 minütigem Vorlauf bei 120 Volt die Auftrennung bei 60 Volt über Nacht.

### 4.3.3.2 NuPAGE System der Firma Invitrogen

Bei diesem System wurden Bis-Tris Fertiggele mit einem 4-12% igem Gradienten verwendet, auf die 10-15 Proben aufgetragen werden konnten. Es wurde mit maximal 20 µg Protein pro Bahn gearbeitet. Das Lysat wurde mit 1/3 Volumen NuPAGE LDS Probenpuffer und 1/10 Volumen Dithiothreitol versetzt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 200 Volt für ca. eine Stunde in 1x NuPAGE-MES-SDS-Laufpuffer.

### 4.3.4 Western Blot Transfer

Beim Western Blot wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die aufgetragenen Proteine konnten danach mit Antikörpern detektiert werden. Für den Transfer wurden das Gel und die Nitrocellulosemembran zwischen zwei Schwämme und 4 Whatmann-Papiere in eine Westernblotkassette eingespannt. Der Zusammenbau erfolgte in einer mit Western Blot-Transferpuffer gefüllten Schale, um zu verhindern, dass zwischen Gel und Membran Luftblasen eingeschlossen wurden. Die Kassette wurde in den mit Transferpuffer gefüllten Tank gehängt, wobei das Gel sich auf der Kathodenseite, die Membran auf der Anodenseite befand.

Der Transfer aus NuPAGE Gelen erfolgte in Blotkammern der Firma Invitrogen. Da es durch den Leitungswiderstand zu Wärmeentwicklung kommen konnte, musste der Transferpuffer durch Einhängen eines Kühlakkus abgekühlt werden. Der Transfer dauerte bei einer Spannung von 200 Volt eine Stunde. Bei dem BioRad System wurde eine BioRad Western Blot Kammer verwendet. Der gesamte Transfer erfolgte bei 4°C im Kühlraum und dauerte zwei Stunden. Der Erfolg des Transfers wurde durch Anfärbung der transferierten Proteine mit Ponceau S überprüft und dokumentiert. Die Anfärbung konnte durch waschen mit TBS rückgängig gemacht werden.

### 4.3.5 Immunodetektion der aufgetrennten Proteine

Zum Nachweis transferierter Proteine wurden spezifische Antikörper verwendet. Um zu verhindern, dass die verwendeten Antikörper unspezifisch an die Nitrocellulosemembran banden, wurde diese mit 5% BSA für mindestens eine Stunde blockiert. Überschüssiges BSA wurde durch dreimaliges waschen mit TBS-T entfernt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der spezifisch das Protein von Interesse erkannte, erfolgte auf einem Rollenmisch-Gerät über Nacht. Die Antikörper wurden in TBS-T verdünnt. Ungebundener Primärantikörper wurde durch mehrmaliges waschen mit TBS-T entfernt. Wiederholtes waschen verbesserte die Detektion. Der Zweitantikörper war an HRP gekoppelt und erkannte den Primärantikörper. Die einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte bei RT auf dem Schütteltisch. Der Blot wurde dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor 10 ml des ECL Reagenz (Luminol, Wasserstoffperoxid) zugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde das ECL abgenommen und die Luminiszenz durch Exposition gegen einen Hyper-ECL Film sichtbar gemacht. Die Expositionsdauer war



abhängig von dem Primärantikörper und betrug zwischen 30 Sekunden und mehreren Minuten.

Die densitometrische Analyse der detektierten Proteine erfolgte mit der Aida Image Analyzer™ 4.04 Software der Firma raytest. Hierfür wurde die Intensität der Belichtung des Hyper-ECL Films nach Analyse des Proteins von Interesse mit der korrespondierenden b-Aktin Kontrolle verrechnet. Der Wert der Mediumkontrolle wurde als 100% festgesetzt.

#### 4.3.6 Entfernen von Antikörpern von der Blot-Membran („*Stripping*“)

Durch die Behandlung mit Detergentien und Reduktionsmitteln können an die Westernblot-Membran gebundene Antikörper wieder entfernt werden.

Dafür wurden 25 ml *Stripping*-Lösung zu dem Blot gegeben und 25 Minuten bei 56°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Unter diesen Bedingungen bleiben die auf die Membran geblotteten Proteine zu Großteil gebunden. Der Blot wurde mindestens 5 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend neu mit BSA blockiert. Der Westernblot war dann bereit um mit einem neuen Antikörper inkubiert zu werden.

### 4.4 Statistische Analysen

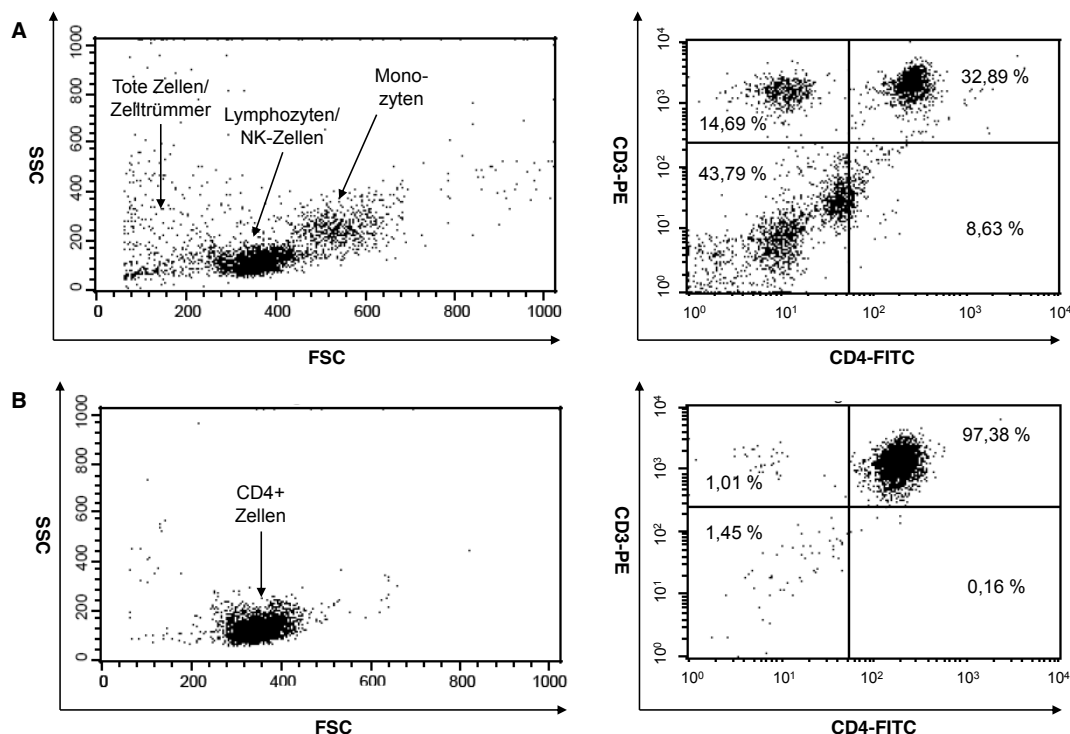
Die statistische Signifikanz von Daten wurde mittels des student's t Test für gepaarte Daten ermittelt.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Zelluläre Zusammensetzung der verwendeten Zellsuspensionen

In der vorliegenden Arbeit wurde in erster Linie mit frisch isolierten „primären“  $CD4^+$  T Zellen gearbeitet. Die für die Versuche eingesetzten primären  $CD4^+$  T Zellen mussten möglichst frei von Kontamination durch andere Zellpopulationen sein, um ausschließen zu können, dass die Reaktion der  $CD4^+$  T Zellen durch „Nicht  $CD4^+$  T Zellen“ beeinflusst wurde.

Für die Isolierung von  $CD3^+ CD4^+$  T Zellen wurden initial mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMZ) gesunder Spender aufgearbeitet. Die durchflusszytometrische Analyse der PBMZ an Hand von Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) zeigt, dass sich 3 Populationen unterscheiden lassen: a) tote Zellen, b) Lymphozyten und NK Zellen und c) Monozyten und Makrophagen (Abb. 5.1 A, links). Tote Zellen sind klein und streuen weniger Licht als lebende, mononukleäre Zellen. Makrophagen sind granulärer als Lymphozyten und streuen das Licht stärker. Die Lymphozytenpopulation setzt sich aus B und T Zellen zusammen.



**Abb. 5.1: Durchflusszytometrische Analyse von PBMZ und MACS separierten  $CD4^+$  T Zellen.** A) links: Streulichtanalyse von PBMZ, rechts: Fluoreszenzanalyse von CD3-PE und CD4-FITC gefärbten PBMZ. B) wie A) für MACS separierte Zellen

CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen umfassten bei dem hier beispielhaft dargestellten Spender nur knapp 33% der Lymphozyten (Abb. 5.1 A, Quadrant oben rechts). Neben CD4<sup>+</sup> T Zellen waren auch zahlreiche CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> Zellen vorhanden. Bei dieser Population handelt es sich in erster Linie um zytotoxische CD8<sup>+</sup> T Zellen und  $\gamma\delta$  T Zellen (Abb. 5.1 A, Quadrant oben links). Neben T Zellen setzen sich die PBMZ aus CD19 exprimierenden B Zellen, CD14 exprimierenden Monozyten, CD56 positiven NK Zellen und Subpopulationen von dendritischen Zellen (CD141 bzw. CD303 exprimierend) zusammen.

Nach Isolierung der CD4<sup>+</sup> positiven T Zellen durch magnetische Negativ-Separation erschienen diese in Bezug auf Größe und Granularität deutlich homogener. In der in Abb. 5.1 B dargestellten Isolierung exprimierten 97,38% der Zellen CD3 und CD4 auf der Zelloberfläche, die Population war somit sehr rein. CD19<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD141<sup>+</sup> und CD303<sup>+</sup> Zellen waren praktisch nicht mehr nachweisbar. Der Anteil von CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ -TZR positiven T Zellen lag unter 0,5%. Diese Werte waren typisch für die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführte Separation von CD4<sup>+</sup> T Zellen. Tabelle 5.1 fasst die Ergebnisse von 8 Spendern zusammen.

**Tabelle 5.1:** Prozentsatz verschiedener Zellpopulationen in Zellsuspensionen 8 verschiedener Spender nach magnetischer Negativseparation

	CD3/CD4	CD3/CD8	CD3/ $\gamma\delta$	CD19	CD14	CD56	CD141	CD303
<b>CD4<sup>+</sup></b>	98,28	0,03	0,25	0,03	0,14	0,02	0,17	0,03
<b>Isolierung</b>	(+/-0,64)	(+/-0,05)	(+/-0,15)	(+/-0,02)	(+/-0,11)	(+/-0,02)	(+/-0,11)	(+/-0,03)

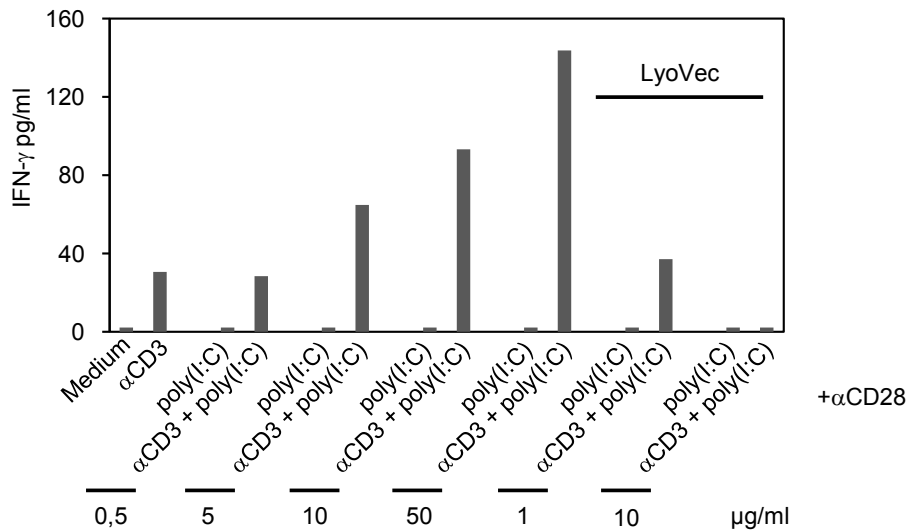
## 5.2 Poly(I:C) Stimulation verstärkt die TZR-induzierte IFN- $\gamma$ Produktion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von CD4<sup>+</sup> T Zellen auf Stimulation mit dem synthetischem dsRNA Analog poly(I:C) und des TZR/CD28 Signalwegs untersucht. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  T Zellen, die sowohl mit poly(I:C) als auch über den TZR stimuliert wurden, deutlich mehr IFN- $\gamma$  produzierten, als  $\gamma\delta$  T Zellen, die nur über den TZR stimuliert wurden [27].

Für  $\alpha\beta$  T Zellen war in den früheren Arbeiten keine eindeutig verstärkte IFN- $\gamma$  Produktion nach Kostimulation mit poly(I:C) nachweisbar. Die Zytokinproduktion durch  $\alpha\beta$  T Zellen erwies sich als generell geringer, als die der  $\gamma\delta$  T Zellen, sodass sich die Produktion von IFN-

$\gamma$  durch den eingesetzten *Cytokine Array* nach anti-CD3 mAk/poly(I:C) Stimulation im Vergleich zu  $\gamma\delta$  T Zellen nur in sehr geringem Ausmaß nachweisen ließ.

Es wurde initial die Produktion von IFN- $\gamma$  durch negativ isolierte CD4<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation über den TZR und in Anwesenheit von poly(I:C) und anti-CD28 mAk im ELISA verifiziert.



**Abb. 5.2: IFN- $\gamma$  Konzentration im Überstand nach TLR3 Stimulation.** Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen poly(I:C) mit oder ohne 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk OKT3 ( $\alpha$ CD3) stimuliert. Bei allen Ansätzen wurde mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk kostimuliert. Die Überstände wurden nach 48 Stunden genommen und in einem ELISA untersucht.

Wie in Abb. 5.2 dargestellt, induzierte poly(I:C) alleine keine IFN- $\gamma$  Sezernierung. Diese wurde erst ausgelöst, wenn der TZR bzw. CD3 durch den anti-CD3 mAk OKT3 quervernetzt wurde, zusätzlich wurden alle für diesen Versuch stimulierten Zellen mit einem agonistischen anti-CD28 mAk behandelt. Der TLR3 Ligand zeigte konzentrationsabhängig einen kostimulatorischen Effekt.

Die höchste eingesetzte poly(I:C) Konzentration betrug 50  $\mu$ g/ml. Diese Konzentration war in Vorversuchen der Arbeitsgruppe als optimal für die Kostimulation von  $\gamma\delta$  T Zellen ermittelt worden. Auch in Publikationen, die sich mit der Stimulation mit poly(I:C) beschäftigen, ist 50  $\mu$ g/ml eine gebräuchliche Einsatzkonzentration [49, 62, 63], sodass in den folgenden Versuchen diese poly(I:C) Konzentration gewählt wurde. Poly(I:C) war auch komplexiert mit LyoVec verfügbar. LyoVec ist ein Lipid basiertes Transfektionsreagenz, das Membranen destabilisiert und so den direkten Eintritt von poly(I:C) in das Zytoplasma gewährleistet. In dieser Form ist nach Literaturangaben nicht TLR3, sondern der im Zytoplasma lokalisierte Mustererkennungsrezeptor MDA-5 der Rezeptor für poly(I:C) [64, 65]. Poly(I:C) LyoVec

wirkte in höheren Konzentrationen (10µg/ml) toxisch, in niedrigeren Konzentrationen (1µg/ml) zeigte es minimale Effekte (Abb. 5.2, rechts).

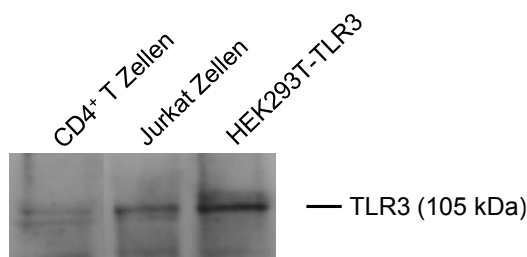
Um zu überprüfen, ob der toxische Effekt von poly(I:C) LyoVec auf das Transfektionsreagenz zurückzuführen war oder die Kombination von poly(I:C) mit LyoVec Zelltod auslöste, wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit TLR8 Liganden stimuliert, die ebenfalls mit LyoVec komplexiert vorlagen. Die Exposition von CD4<sup>+</sup> T Zellen gegenüber den TLR8 Liganden ssRNA40-LyoVec und ssPolyU-LyoVec löste keine IFN-γ Sezernierung aus (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie poly(I:C) hatten jedoch die TLR8 Liganden einen kostimulatorischen Effekt auf die durch CD3 Kreuzvernetzung induzierte IFN-γ Sezernierung. Toxische Effekte durch LyoVec waren hier nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Diese beruhten vielmehr auf der Kombination des Liganden poly(I:C) mit LyoVec. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass TLR3 und nicht MDA-5 der Rezeptor für unkomplexiertes poly(I:C) in humanen CD4<sup>+</sup> T Zellen ist.

### 5.3. TLR3 Expression in CD4<sup>+</sup> T Zellen

#### 5.3.1 CD4<sup>+</sup> T Zellen exprimieren TLR3

In Untersuchungen von Wesch und Kollegen wurde gezeigt, dass αβ T Zellen TLR3 exprimieren [27]. Über die Expression von TLR3 in CD4<sup>+</sup> T Zellen, einer Subpopulation der αβ T Zellen, lagen zu Beginn der Doktorarbeit jedoch noch keine Daten vor, sodass sie initial sowohl mittels Westernblot als auch durchflusszytometrisch analysiert wurde. Parallel wurde die Expression von TLR3 in Jurkat Zellen, einer CD4<sup>+</sup>, gut charakterisierten leukämischen T Zelllinie, untersucht.

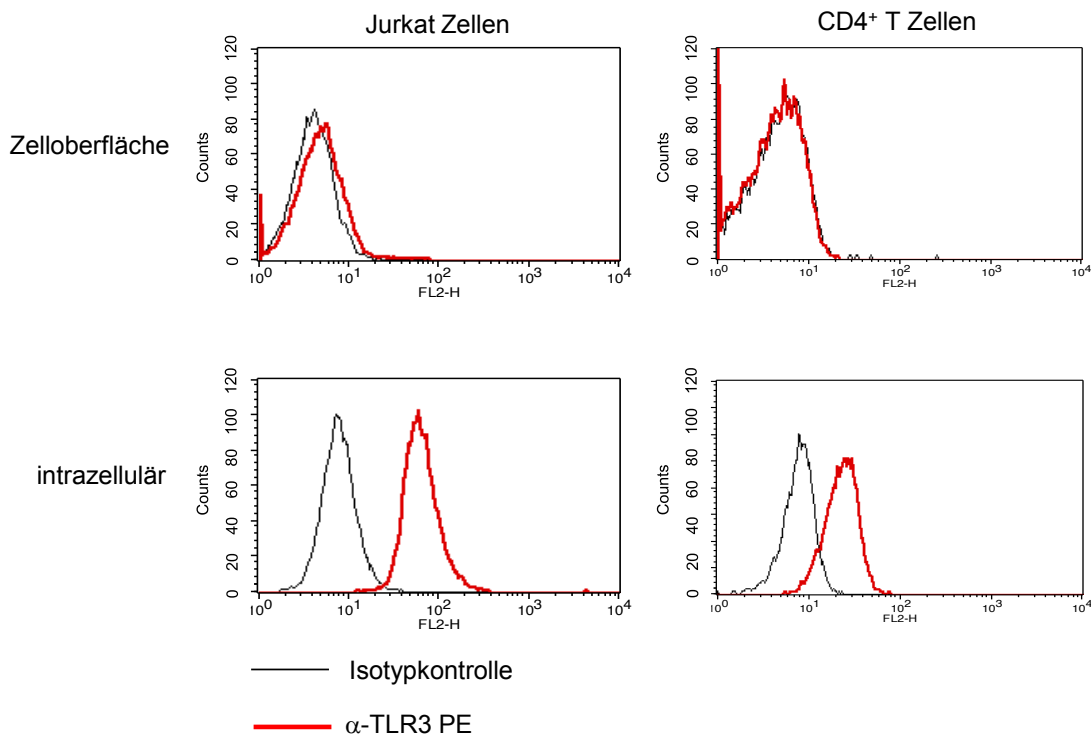
Für die proteinbiochemische Analyse wurden Gesamtzelllysate von primären CD4<sup>+</sup> T Zellen, Jurkat Zellen und HEK293T Zellen, die mit einem TLR3 codierenden Plasmid stabil transfiziert waren, angefertigt und durch Westernblotanalyse untersucht (Abb. 5.3). Die Zelllysate der transfizierten HEK293T Zellen dienten hierfür als Positivkontrolle.



**Abb. 5.3: Westernblotanalyse der TLR3 Expression.** Jeweils 60 µg Gesamtprotein von CD4<sup>+</sup> T Zellen, Jurkat Zellen und TLR3 transfizierten HEK293T Zellen wurden aufgetragen und mit α-TLR mAb 40C1285.6 markiert.

TLR3 hat eine Größe von 105 kDa. Die stärkste Expression wiesen erwartungsgemäß die transfizierten HEK293T Zellen auf. Die schwächste, aber immer noch gut nachweisbare Expression, ist in den primären CD4<sup>+</sup> T Zellen zu finden.

Die Durchflusszytometrie erlaubt es die zelluläre Lokalisation eines Proteins näher einzugrenzen, es kann zwischen Expression auf der Zelloberfläche bzw. im Zelllumen unterschieden werden. Erwartungsgemäß war TLR3 bei frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht, bei Jurkat-Zellen nur in geringem Umfang auf der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 5.4, oben). Nach Permeabilisierung der Zellen konnte eine deutliche intrazelluläre Expression nachgewiesen werden (Abb. 5.4, unten). Dies deckt sich mit Daten aus Veröffentlichungen, in denen in erster Linie eine intrazelluläre Lokalisation von TLR3 unter anderem in humanen dendritischen Zellen, Makrophagen und  $\gamma\delta$  T Zellen beschrieben wurde [27, 38, 45].

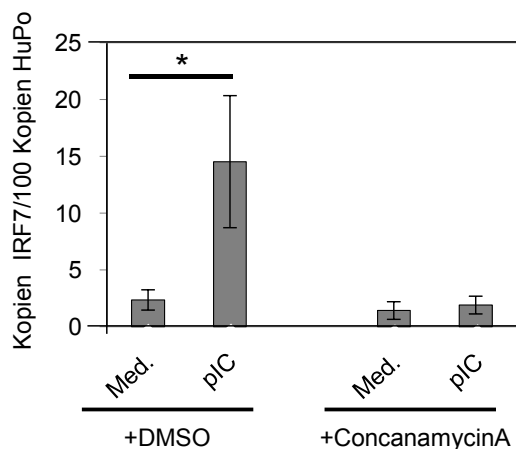


**Abb. 5.4: Durchflusszytometrische Analyse der TLR3 Expression.** Zur Analyse der TLR3 Expression in Jurkat und CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde der PE konjugierter anti-TLR3 mAk TLR3.7 (dicke Linie) sowie als Kontrolle ein Antikörper des gleichen Isotyps eingesetzt (dünne Linie). Für die intrazelluläre Färbung (unten) wurden die Zellen permeabilisiert.

### 5.3.2 TLR3 ist der Rezeptor für poly(I:C) in CD4<sup>+</sup> T Zellen

Neben TLR3 ist auch die zytoplasmatisch lokalisierte Helicase MDA-5 in der Lage poly(I:C) zu erkennen [66]. Während die TLR3-Signaltransduktion durch das Adaptorprotein TRIF vermittelt wird, nutzt MDA-5 den Adaptor Interferon- $\beta$  Promotor Stimulator (IPS-1). Die Stimulation beider Rezeptoren führt jedoch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und so zur Transkription des Gens *Irf7*. TLR3 ist im Gegensatz zu MDA-5 endosomal lokalisiert. Die Bindung des Liganden durch TLR3 steht in Abhängigkeit zu dem pH Wert. Anhand von *in vitro filter binding assays* konnten Fukuda et al. zeigen, dass bei neutralem pH der Ligand nur zu sehr geringem Umfang gebunden wird. Die Affinität steigt mit abnehmendem pH Wert und erreicht ein Maximum bei pH 4,2. MDA-5 dagegen bindet poly(I:C) im Zytoplasma bei neutralem pH [34].

Um zu unterscheiden, ob IRF3 nach poly(I:C) Stimulation durch MDA-5 oder TLR3 aktiviert wird, wurde die *Irf7* Transkription von ConcanamycinA vorbehandelten Zellen mit unbehandelten Zellen verglichen. ConcanamycinA inhibiert die V-Typ ATPase und somit die endosomale Ansäuerung. Nach Concanamycin Behandlung sollte TLR3 demnach nicht durch seinen Liganden aktiviert werden können.



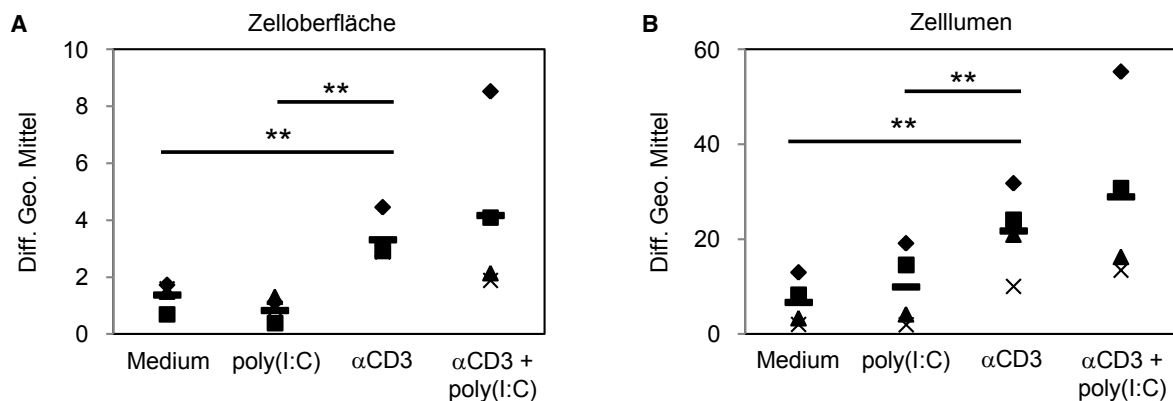
**Abb. 5.5: Transkription von *Irf7* nach poly(I:C) Stimulation.** CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden für 90 Minuten mit DMSO (links) oder ConcanamycinA (rechts) vorinkubiert, mit PBS gewaschen und über 5 Stunden in Medium kultiviert oder mit 50 $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC) stimuliert. Die Expression von *Irf7* in den unterschiedlich behandelten Zellen wurde in Relation gesetzt zu der Expression von HuPo. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) angegeben

Die als Kontrolle mit DMSO vorinkubierten, primären CD4 T Zellen induzierten die Transkription des Gens *Irf7* bei allen untersuchten Spendern ( $n=3$ ), sobald sie mit poly(I:C) stimuliert wurden (Abb. 5.5). Nach Vorbehandlung der Zellen mit ConcanamycinA war keine Induktion von *Irf7* mehr nachweisbar. Die Erkennung des Liganden poly(I:C) und die nachfolgende Induktion der *Irf7* Transkription war also abhängig von einem niedrigen pH in den Endosomen, was auf TLR3 als Rezeptor für poly(I:C) hinwies.

### 5.3.3 Regulation der TLR3 Expression in CD4<sup>+</sup> T Zellen

In den folgenden Versuchen wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C), über den TZR oder in Kombination mit beiden Stimuli stimuliert. Um festzustellen, ob die TLR3 Expression durch diese Stimulationsbedingungen beeinflusst wurde, wurden primäre CD4<sup>+</sup> T Zellen über 1-3 Tage mit den entsprechenden Liganden inkubiert und anschließend wie mit dem anti-TLR3 mAk TLR3.7 markiert. Die Regulation auf Transkriptionsebene wurde durch qRT-PCR untersucht.

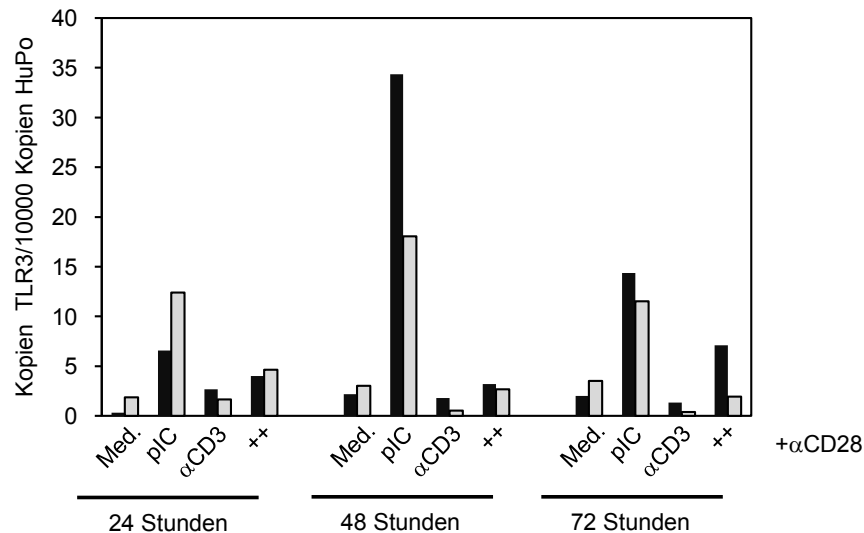
Die stärkste intrazelluläre Expression von TLR3 ließ sich nach dreitägiger Stimulation nachweisen. Wie in Abb. 5.6 dargestellt, hatte die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von TLR3 auf der Zelloberfläche (Abb. 5.6 A) oder innerhalb der Zelle (Abb. 5.6 B). Nach Stimulation des TZRs durch Quervernetzung mit agonistischen anti-CD3 mAk wurde die TLR3 Expression intrazellulär verstärkt. Anti-CD3 Stimulation führte auch zu einer geringfügig stärkeren Anfärbung von TLR3 auf der Zelloberfläche. Eine kombinierte Stimulation mit poly(I:C) und über den TZR hatte keine signifikante Steigerung der Expression zur Folge. Die Oberflächenexpression blieb auch nach Kreuzvernetzung des TZRs sehr gering und bewegte sich knapp über der Nachweisgrenze (Abb. 5.6 A).



**Abb. 5.6: TLR3 Expression nach Stimulation mit poly(I:C) +/- anti-CD3 mAk.** CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden für 72 Stunden mit den angegebenen Kombinationen von Liganden bzw. mAk stimuliert. Bei allen Ansätzen wurde CD28 über einen agonistischen anti-CD28 mAk quervernetzt. Für die intrazelluläre Färbung (B) wurden die Zellen permeabilisiert. Die Färbungen erfolgten mit dem PE gekoppelten anti-TLR3 mAk TLR3.7. Dargestellt sind die Differenzen zwischen dem geometrischen Mittel der TLR3 markierten Zellen und der korrespondierenden Isotypkontrollen. A) Auf der Zelloberfläche exprimiertes TLR3. B) Im Zelllumen exprimiertes TLR3. Die verschiedenen Symbole repräsentieren verschiedene Spender, der Mittelwert ist als Balken wiedergegeben, Signifikanzen sind als \* (p < 0,05) und \*\* (p < 0,01) angegeben.



Ein gänzlich anderes Bild bot sich bei Analyse der Transkription des *Tlr3* Gens (Abb. 5.7). Hierfür wurde die relative Anzahl der *Tlr3* Transkripte ins Verhältnis zu der Anzahl der Transkripte der humanen Polymerase II (HuPo) gesetzt. Die *Tlr3*-mRNA Expression war nach Stimulation mit poly(I:C) nach 24-72 Stunden deutlich erhöht. Maximale Expression wurde nach 48 Stunden gemessen. Dagegen hatte Kreuzvernetzung mit anti-CD3 mAk keinerlei Effekt auf die Transkription des Gens und auch kombinierte Stimulation mit poly(I:C) und anti-CD3 mAk (++) hatte nur einen leicht verstärkenden Einfluss.



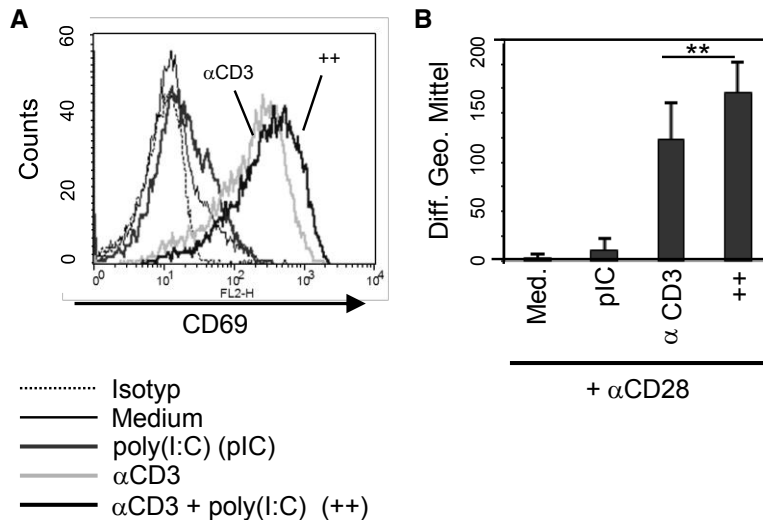
**Abb. 5.7: Transkription von *Tlr3* nach Stimulation mit poly(I:C), anti-CD3 mAk oder Kombination beider Stimuli.** Jeweils  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden für 24-72 Stunden mit 50 µg/ml poly(I:C) (pIC), 2 µg/ml OKT3 (αCD3) oder einer Kombination von beidem (++) stimuliert. Alle Zellen wurden zusätzlich über CD28 stimuliert. Die Kopienzahl der *Tlr3* Transkripte wurde auf 10000 Kopien des Haushaltsgens Humane Polymerase II bezogen. Dargestellt sind die Werte zweier unterschiedlicher Spender.

## 5.4 Auswirkung der Stimulation von TLR3 auf CD4<sup>+</sup> T Zellen

### 5.4.1 TLR3 Stimulation verstärkt die TZR- induzierte Expression von Aktivierungsmarkern

Die Aktivierung von T Zellen induziert die Expression, bzw. die Hochregulierung der Expression zahlreicher Moleküle auf der Zelloberfläche. Ein gut etablierter Aktivierungsmarker ist das Molekül CD69. Um die Reaktivität von CD4<sup>+</sup> T Zellen auf TLR3 Stimulation zu untersuchen, wurde die Expression von CD69 auf Zellen von 6 verschiedenen Spendern nach TLR3 Stimulation, Kreuzvernetzung von CD3 und der Kombination der beiden Stimuli untersucht. In allen Ansätzen wurden die Zellen über CD28 kostimuliert. In

unstimulierten Zellen (Med.) war CD69 nur sehr schwach auf der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 5.8). Stimulation mit poly(I:C) hatte nur einen geringen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD69. Nach TZR/CD28 Stimulation kam es zu einer ausgeprägten Hochregulierung, die durch Kostimulation mit poly(I:C) weiter verstärkt wurde.



**Abb. 5.8: Durchflusszytometrische Analyse der CD69 Expression auf primären CD4<sup>+</sup> T Zellen.** Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC), 2  $\mu$ g/ml OKT3 ( $\alpha$ CD3) oder mit einer Kombination Beider (++) stimuliert und mit dem PE gekoppelten anti-CD69 mAk L78 markiert. Alle Zellen wurden zusätzlich über CD28 stimuliert.

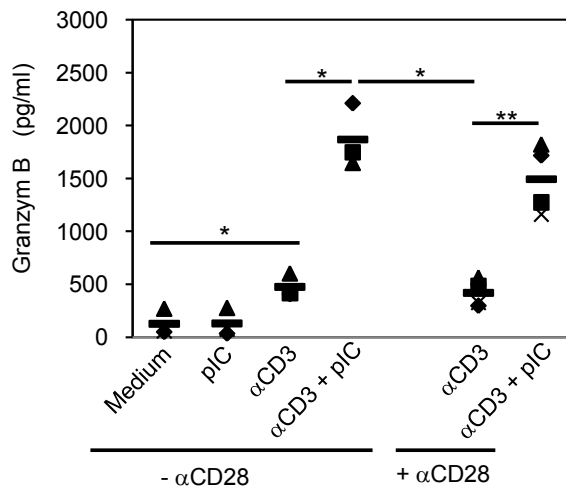
A) Histogrammdarstellung einer repräsentativen Färbung. B) Dargestellt sind die Differenzen des geometrischen Mittels zwischen der CD69 Analyse und der korrespondierenden Isotyp-kontrolle von 5 Spendern. \*\* = hochsignifikant ( $p < 0,01$ ).

#### 5.4.2 TLR3 Kostimulation verstärkt die Granzym B Produktion

Granzym B ist ein gut charakterisiertes Effektormolekül zytotoxischer Zellen wie CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen,  $\gamma\delta$  T Zellen und NK Zellen. In unstimulierten zytotoxischen Zellen liegt es gespeichert in zytoplasmatischen Granula vor und kann nach Aktivierung sezerniert werden. Granzym B ist eine Serinprotease, die innerhalb der Zielzelle zahlreiche Substrate erkennt. So können Caspase-3 und -7 gespalten werden, wodurch Caspase abhängiger Zelltod induziert wird [67]. Auch für virusspezifische CD4<sup>+</sup> T Zellen ist die Expression von Granzymen beschrieben, ihre Funktion scheint jedoch eher in der Spaltung von viralen Proteinen zu liegen, als in der Induzierung von Apoptose. [68, 69]. Kürzlich konnten wir zeigen, dass TLR2 Liganden die Granzym B Sezernierung durch CD4<sup>+</sup> T Zellen modulieren können [9], weshalb wir auch die Rolle von TLR3 in der Regulation der Granzym B Sezernierung mittels ELISA untersuchten.

Dabei wurde deutlich, dass poly(I:C) alleine keinen Einfluss auf die Granzym B Produktion von CD4<sup>+</sup> T Zellen hatte, die Granzym B Produktion von CD3/CD28 stimulierten Zellen durch

poly(I:C) jedoch mehr als verdoppelt wurde (Abb. 5.9). poly(I:C) musste in diesem Zusammenhang also einen stärkeren kostimulatorischen Effekt auf anti-CD3 mAk stimulierte Zellen haben als CD28 Kostimulation. Dieses Ergebniss war der Anlass die kostimulatorische Kapazität von TLR3 mit der von CD28 auf die funktionelle Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen zu vergleichen.

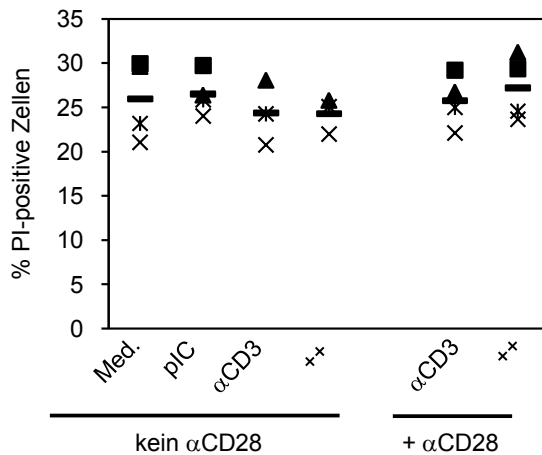


**Abb. 5.9: Granzym B Konzentration im Überstand.**  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen/ml von 4 verschiedenen Spendern wurden für 24 Stunden stimuliert. Die Granzym B Konzentration im Überstand wurde durch ELISA bestimmt. Die Zellen wurden mit 50 µg/ml poly(I:C), 2 µg/ml anti-CD3 mAk OKT3 (αCD3), einer Kombination beider Stimuli sowie mit einem agonistischen αCD28 Antikörper (links) oder ohne CD28 Stimulus (rechts) kultiviert. Die verschiedenen Symbole repräsentieren verschiedene Spender, der Mittelwert ist als Balken wiedergegeben. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) angegeben.

Es zeigte sich, dass für die Produktion von Granzym B die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 mAk ausreichend war. CD28 Kostimulation hatte keinen Einfluss auf die Konzentration von Granzym B im Überstand der Zellkultur (Abb. 5.9). TLR3 Kostimulation dagegen bewirkte sowohl in CD3, als auch in CD3/CD28 stimulierten Zellen, eine signifikante, massiv verstärkte Granzym B Expression. Der kostimulatorische Effekt von poly(I:C) war in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die nur mit anti-CD3 mAk stimuliert wurden ausgeprägter als in Zellen, die zusätzlich noch über CD28 stimuliert wurden.

#### 5.4.3 Einfluss von poly(I:C) auf den Zelltod

Aufgrund des signifikanten Effekts, den TLR3 Kostimulation auf die Sezernierung von Granzym B hatte und der gut charakterisierten proapoptischen Wirkung des Moleküls, wurde auch die Zellmortalität bestimmt. Dafür wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Liganden wie in Abb. 5.10 angegeben stimuliert, die toten Zellen durch Propidiumjodid (PI) erfasst und am Durchflusszytometer quantifiziert.



**Abb. 5.10: Zelltod nach poly(I:C) Stimulation.**  $1 \times 10^6$   $CD4^+$  T Zellen/ml von 4 verschiedenen Spendern wurden für einen Tag stimuliert. Tote Zellen wurden mit PI markiert. Die Zellen wurden mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C), 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk OKT3, ( $\alpha$ CD3) einer Kombination beider Stimuli (++) sowie mit einem agonistischen, monoklonalen anti-CD28 Antikörper (links), oder ohne CD28 Stimulus (rechts) kultiviert. Die verschiedenen Symbole repräsentieren verschiedene Spender, der Mittelwert ist als Balken wiedergegeben.

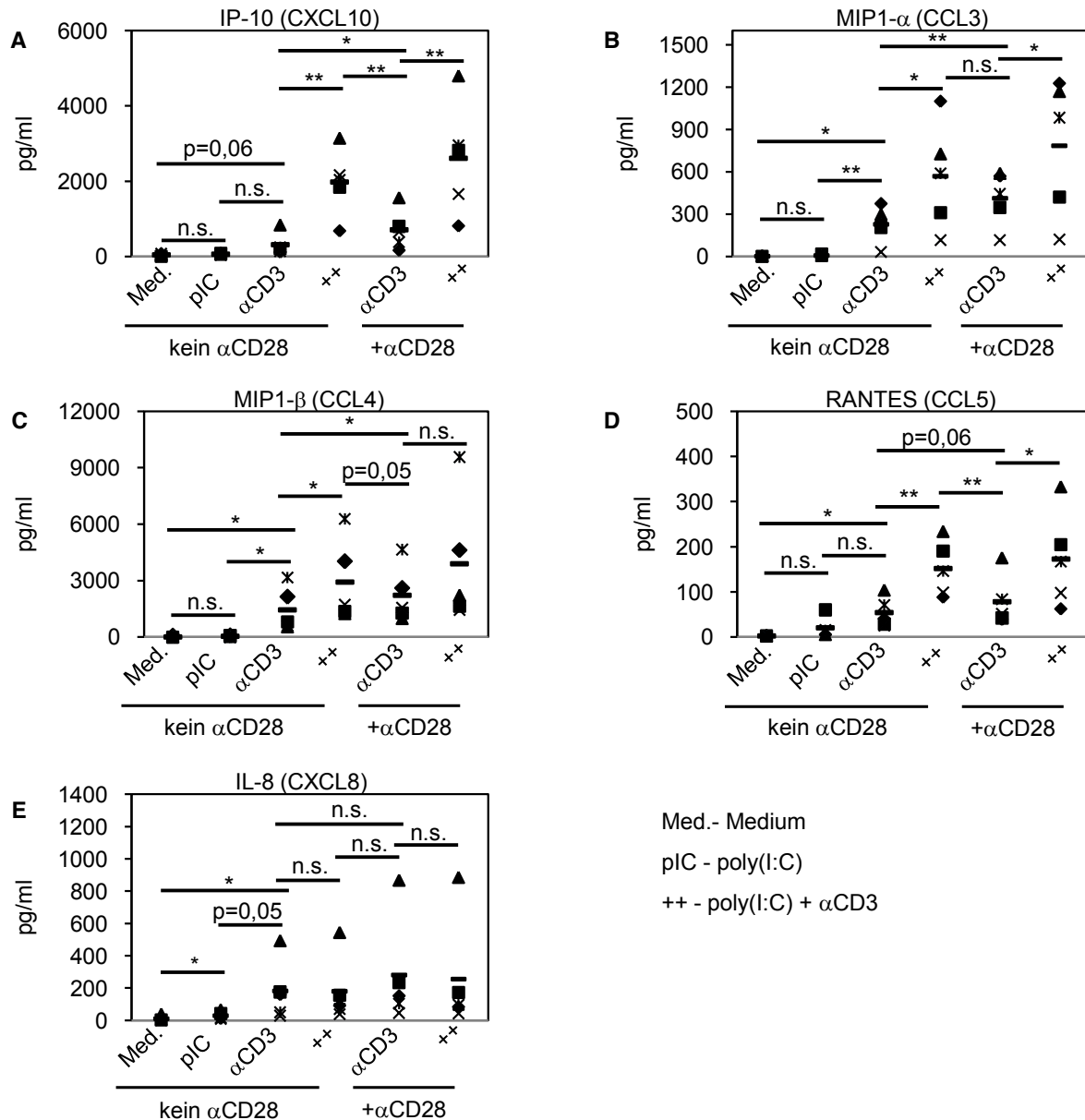
TLR3 Stimulation löste weder im Vergleich zur Mediumkontrolle noch im Vergleich zur Stimulation des TZR Signalwegs mit und ohne CD28 Kostimulation eine signifikante Veränderung des Zelltods aus (Abb. 5.10). Unabhängig von der Stimulation lag der Mittelwert des Prozentsatzes der PI positiven Zellen zwischen 24 und 28 %. Somit korrelierten sowohl die verstärkten Granzym B Konzentrationen im Überstand nach 24-stündiger Stimulation des TZR (+/- CD28), als auch die massiv gesteigerte Produktion nach zusätzlicher TLR3 Stimulation nicht mit einer veränderten Induktion von Zelltod.

#### 5.4.4 Einfluss von TLR3 Kostimulation auf die Zytokin- und Chemokinexpression

$CD4^+$  T Zellen sind in der Lage neben  $IFN-\gamma$  eine Vielzahl weiterer Zytokine und Chemokine zu exprimieren. Durch den *Cytometric Bead Arrays* (CBA) war es möglich zahlreiche Analyte parallel zu bestimmen. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf Zyto- und Chemokine gelegt, die antivirale Eigenschaften aufweisen bzw. die bei einer Virusinfektion verstärkt exprimiert werden (siehe 1.3.3). Analysiert wurden die Expression von IP-10 (CXCL10), MIP1- $\alpha$  (CCL3), MIP1- $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), und IL-8 (CXCL8) nach 24, 48 und 72 Stunden. In Abb. 5.11 sind die Daten nach 48-stündiger Stimulation gezeigt, die sich quantitativ, aber nicht qualitativ von den Messergebnissen nach anderen Zeitpunkten unterschieden.

TLR3 Stimulation allein (pIC) hatte keinen Effekt auf die Expression der untersuchten Chemokine (Abb. 5.11, A-D), für IL-8 ließ sich eine signifikante, wenn auch äußerst schwache Induktion durch poly(I:C) nachweisen (Abb. 5.11, E). Auch CD28 Stimulation alleine hatte keinen Effekt auf die Zytokinexpression (Daten nicht gezeigt). Nach Stimulation des TZR Signalwegs durch anti-CD3 mAk waren alle untersuchten Zytokine und Chemokine im Überstand nachweisbar. Die Zunahme war für alle Zytokine mit Ausnahme von IP-10

( $p=0,056$ ) signifikant (Abb. 5.11 A). Kostimulation über CD28 (anti-CD3 + anti-CD28 mAk) resultierte in einer verstärkten Expression aller untersuchten Proteine im Überstand. Lediglich bei RANTES (Abb. 5.11 D) und IL-8 (Abb. 5.11 E) war die Zunahme nicht signifikant. Auch TLR3 Kostimulation (++) verstärkte die Expression der untersuchten Chemokine.



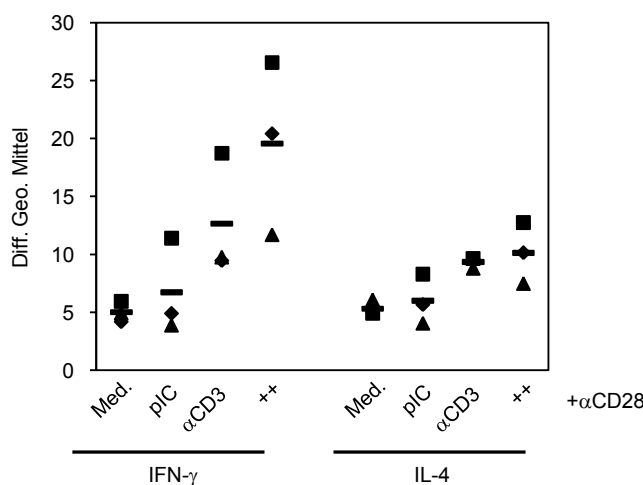
**Abb. 5.11: Zytokin- und Chemokinproduktionen von TLR3 kostimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen.**  $1 \times 10^6$  Zellen/ml von 5 verschiedenen Spendern wurden in verschiedenen Kombinationen über den TLR durch den anti-CD3 mAk OKT3, mit poly(I:C) und mit anti-CD28 mAk für 48 Stunden wie in den Graphiken angegeben stimuliert. Kombinierte CD3/TLR3 Stimulation ist als ++ angegeben. Der Überstand wurde abgenommen und die Konzentration von IP-10 (A), MIP1- $\alpha$  (B), MIP1- $\beta$  (C), RANTES (D) und IL-8 (E) durch das BD CBA Human Flex Set bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, die Balken stellen den Mittelwert dar. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ), bzw. n.s. (nicht signifikant) angegeben.

Die TZR induzierte Sezernierung von IP-10, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  und RANTES, nicht aber von IL-8, wurde durch poly(I:C) signifikant, zum Teil hochsignifikant, gesteigert (Abb. 5.11 A-D). Dabei erwies sich der kostimulatorische Effekt von TLR3 für IP-10 und RANTES sogar als hochsignifikant stärker als bei Kostimulation über CD28. Auch für MIP1- $\alpha$  und MIP1- $\beta$  Produktion ließ sich nach TLR3 Kostimulation eine deutliche, aber nicht signifikante Steigerung im Vergleich zu CD28 Kostimulation nachweisen. Kombinierte TZR Kostimulation über CD28 und TLR3 (++ +  $\alpha$ CD28) führte bei den zuvor aufgeführten Chemokinen zur stärksten Expression im Vergleich zu allen untersuchten Stimuli.

Anders stellten sich die Ergebnisse in Bezug auf IL-8 dar. TLR3 Kostimulation hatte keinen Effekt auf die anti-CD3 und anti-CD3/CD28 mAk induzierte Proteinexpression (Abb. 5.11 E).

#### 5.4.5 TLR3 Kostimulation forciert die Th1 Differenzierung

IL-4 spielte eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen in Th2 Zellen (siehe 1.1.2) und wurde daher eingehender im Vergleich zu dem Th1 Zytokin IFN- $\gamma$  untersucht. Durch Analyse von Zellkulturüberständen mit CBA und ELISA ließ sich keine IL-4 Produktion durch CD4<sup>+</sup> T Zellen nachweisen. Daher wurde die intrazelluläre Expression des Th1 Zytokins IFN- $\gamma$  und des Th2 Zytokins IL-4 mit Hilfe entsprechender mAk durchflusszytometrisch analysiert.



**Abb. 5.12: Durchflusszytometrische Analyse von intrazellulärem IL-4 und IFN- $\gamma$ .** CD4 T Zellen wurden für 48 Stunden in Medium inkubiert (Med.), mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC), mit 2  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3 Antikörper ( $\alpha$ CD3) oder einer Kombination beider Stimuli (++) stimuliert. Zusätzlich wurde mit 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28 Antikörper kostimuliert. Drei Stunden vor Ablauf der Inkubation wurde Monensin zu den Zellen gegeben um die Exozytose der Zytokine zu unterbinden. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert, die Zytokine mittels Fluorophor markierter Antikörper markiert und am Durchflusszytometer analysiert. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, die Balken stellen den Mittelwert von drei Spendern dar.

IFN- $\gamma$  und IL-4 wurden in unstimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen (Med.) in vergleichbarem Ausmaß exprimiert (Abb. 5.12). Stimulation von TLR3 verstärkte bei einem Spender sowohl die IFN- $\gamma$ ,

als auch die IL-4 Expression. Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk verstärkte die Expression der beiden Zytokine bei allen Spendern. Nach Kostimulation mit poly(I:C) ließ sich, wie schon durch ELISA ermittelt (Abb. 5.2), eine deutlich verstärkte IFN- $\gamma$  Expression nachweisen. Die IL-4 Expression wurde dagegen durch poly(I:C) Kostimulation kaum beeinflusst (Abb. 5.12).

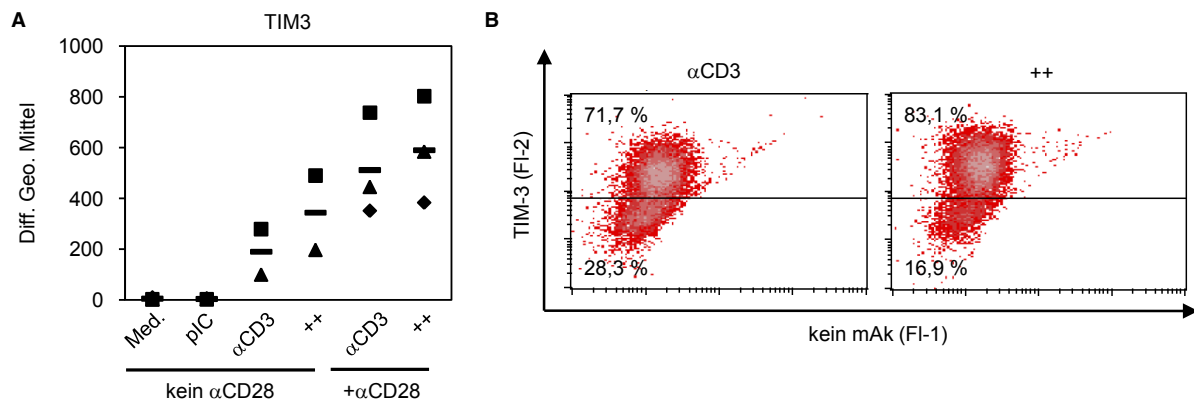
Somit lässt sich der Einfluss der TLR3 Kostimulation auf die Zytokin- und Chemokinexpression von CD4<sup>+</sup> T Zellen nach CD3/CD28 Stimulation wie folgt zusammenfassen:

**Tabelle 5.2:** Tabellarische Zusammenfassung des Einflusses der TLR3 Kostimulation auf CD3/CD28 stimulierte CD4<sup>+</sup> T Zellen.

	IL-4	IL-8	MIP1- $\alpha$	MIP1- $\beta$	RANTES	IFN- $\gamma$
<b>Effekt der TLR3 Kostimulation</b>	→	→	↑	↑	↑	↑

Abkürzungen: ↑ Hochregulation, → keine Veränderung

Neben dem unterschiedlichen Expressionsprofil von IFN- $\gamma$  und IL-4 ist die Th1/Th2 Differenzierung durch die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet in Th1 Zellen und GATA3 in Th2 Zellen gekennzeichnet. Die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in CD4<sup>+</sup> T Zellen in Abhängigkeit von TLR3 Kostimulation wurde durch qRT-PCR untersucht. Die Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig und unterschieden sich stark zwischen CD4<sup>+</sup> T Zellen verschiedener Spender (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Expression von TIM-3, eines Oberflächenmoleküls, das exklusiv auf Th1 Zellen exprimiert wird [70], durch Antikörpermarkierung und Analyse am Durchflusszytometer untersucht.



**Abb. 5.13: Durchflusszytometrische Analyse der TIM-3 Oberflächenexpression.** Für die Untersuchung wurden  $CD4^+$  T Zellen mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC), 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk ( $\alpha$ CD3) und einer Kombination der Stimuli (++) stimuliert. Wie in der Graphik angezeigt wurde zusätzlich mit 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk kostimuliert (links). Nach Stimulation über 4 Tage wurde TIM-3 mit Fluochromgekoppelten mAk markiert und am Durchflusszytometer analysiert. A) Darstellung des geo. Mittels der Fluoreszenzintensität von TIM-3 mAk markierten Zellen. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, Mittelwerte sind als Balken dargestellt. B) Dot Blot Darstellung von  $CD4^+$  T Zellen, die nur mit anti-CD3 mAk ( $\alpha$ CD3) und zusätzlich mit poly(I:C) (++) stimuliert wurden.

$CD4^+$  T Zellen, die in Medium kultiviert oder nur über TLR3 stimuliert wurden, exprimierten kein TIM-3 auf der Zelloberfläche (Abb. 5.13 A). Kreuzvernetzung von CD3 induzierte die TIM-3 Expression. Wurde zusätzlich zu CD3 auch CD28 kreuzvernetzt führte dies zu einer deutlich gesteigerten Expression von TIM-3 (Abb. 5.13 A). Die Kostimulation von CD3 und CD3/CD28 stimulierten Zellen mit poly(I:C) steigerte die TIM-3 nochmals Expression deutlich (Abb. 5.13 A/B). Dabei wurde nicht nur die Intensität der der TIM-3 Expression gesteigert, auch der relative Anteil TIM-3 exprimierender  $CD4^+$  T Zellen wurde durch poly(I:C) Kostimulation deutlich gesteigert. (Abb. 5.13 B)

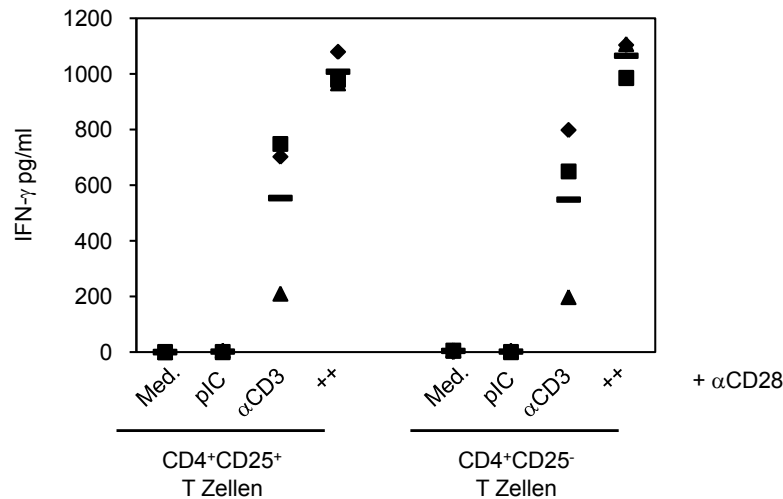
Sowohl das Expressionsprofil von  $IFN-\gamma$ , als auch von TIM-3 wies darauf hin, dass durch poly(I:C) Kostimulation von TLR/CD28 stimulierten Zellen die Differenzierung in Th1 Zellen forciert wurde.

#### 5.4.6 Verstärkte Zytokin- und Chemokinexpression nach poly(I:C) Kostimulation wird nicht durch regulatorische T Zellen vermittelt

Regulatorische T Zellen (Treg) sind von entscheidender Bedeutung für den Abschluss einer Immunantwort und der Vermittlung von Selbsttoleranz. Treg inhibieren die Proliferation von  $CD4^+$  T Zellen und haben auch Einfluss auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen. Wir konnten zeigen, dass Inkubation von Treg mit verschiedenen TLR Liganden deren



suppressive Kapazität verringert [9]. In Kokultur waren präinkubierte, regulatorische T Zellen nicht mehr in der Lage die Proliferation von  $CD4^+$  T Zellen zu unterdrücken. Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression von Zyto- und Chemokinen nach TLR3 Kostimulation konnte somit in verringerter Suppression durch poly(I:C) stimulierte Treg liegen.



**Abb. 5.14: Vergleich der IFN- $\gamma$  Produktion durch Treg depletierte ( $CD4^+CD25^-$ ) T Zellen und die Gesamt- $CD4^+$  T Zellpopulation.** Gesamt- und  $CD25$  depletierte  $CD4^+$  T Zellen eines Spenders wurden über 48 Stunden in Medium inkubiert (Med.), mit 50  $\mu g/ml$  poly(I:C) (pIC), mit 2  $\mu g/ml$   $\alpha CD3$  Antikörper ( $\alpha CD3$ ) oder einer Kombination beider Stimuli (++) stimuliert. In allen Ansätzen wurde zusätzlich mit 1  $\mu g/ml$   $\alpha CD28$  Antikörper kostimuliert. Die Konzentration der Analyte im Überstand wurde mit ELISA untersucht.

Um dies zu untersuchen wurden aus isolierten  $CD4^+$  T Zellen in einem weiteren Isolationsschritt  $CD25^+$  T Zellen, darunter die Treg, depletiert. Die Sezernierung von IFN- $\gamma$  durch  $CD4^+CD25^+$  (mit Treg) und  $CD4^+CD25^-$  (ohne Treg) T Zellen wurde durch ELISA verglichen. Die Treg depletierten  $CD4^+CD25^-$  T Zellen reagierten in vergleichbarer Weise wie  $CD4^+CD25^+$  T Zellen auf die Stimulation mit poly(I:C),  $CD3/CD28$  Quervernetzung sowie Kombination der Stimuli. In Medium kultivierte und mit poly(I:C) stimulierte  $CD4^+$  T Zellen der beiden Zellpopulationen produzierten kein IFN- $\gamma$  (Abb. 5.14). Nach  $CD3/CD28$  Kreuzvernetzung war IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand nachweisbar. Zusätzliche Kostimulation mit poly(I:C) steigerte die IFN- $\gamma$  Produktion nochmals. Sowohl nach  $CD3/CD28$  Stimulation, als auch nach zusätzlicher poly(I:C) Kostimulation war die Produktion von IFN- $\gamma$  durch  $CD4^+CD25^-$  und  $CD4^+CD25^+$  T Zellen vergleichbar (Abb. 5.14). Der verstärkende Einfluss der poly(I:C) Kostimulation auf die IFN- $\gamma$  Produktion durch  $CD4^+$  T Zellen beruhte also nicht darauf, dass die Stimulation von TLR3 die suppressive Wirkung der Treg auf  $CD4^+CD25^-$  T Zellen aufhob.

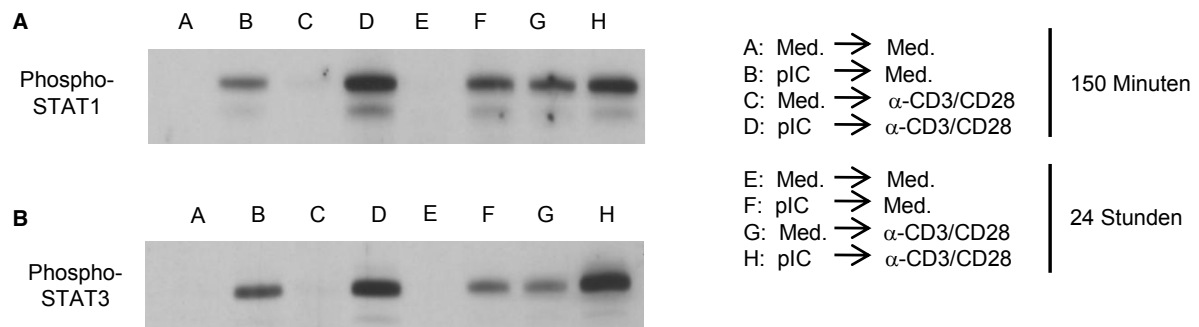
Neben der IFN- $\gamma$  Produktion wurden auch die Ausschüttung von IP-10, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  und RANTES durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen mit CBA<sup>TM</sup> untersucht. Auch für diese Analyte konnte die verstärkte Produktion durch CD4<sup>+</sup> T Zellen nach poly(I:C) Kostimulation nicht auf Aufhebung der suppressiven Wirkung der Treg zurückgeführt werden (Daten nicht gezeigt).

## 5.5 Der Transkriptionsfaktor IRF3

Eine Verstärkung der IFN- $\gamma$  Expression durch TLR3 Kostimulation von TZR/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen ließ sich bereits auf der Ebene des intrazellulären IFN- $\gamma$  nachweisen (Abb. 5.12). Die verstärkende Wirkung der TLR3 Kostimulation auf die IFN- $\gamma$  Produktion beruhte somit nicht auf differentieller Regulation der Exozytose, sondern hatte offenbar ihre Ursache in einer gesteigerter Synthese von IFN- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T Zellen. Daher wurden in weiteren Versuchen die Aktivität verschiedener Signalwege bzw. der durch sie regulierten Transkriptionsfaktoren untersucht.

Der Transkriptionsfaktor IRF3 ist an der Regulation der Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine beteiligt [71]. IRF3 wird nach Stimulation von TLR3 aktiviert (siehe Kap. 1.3.2.1), über einen Einfluss des TZR Signalwegs auf die Aktivität von IRF3 ist jedoch nichts bekannt. Eines der am besten charakterisierten Gene, das durch IRF3 reguliert wird, ist *Ifn- $\beta$* . Die Typ I IFN IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden von verschiedenen Zelltypen, u.a. Fibroblasten und dendritischen Zellen, exprimiert, wogegen CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht als Typ I IFN exprimierende Zellen bekannt sind. Auch im Rahmen der experimentellen Arbeiten zu dieser Promotion konnte keinerlei IFN- $\beta$  in Zellkultur Überständen von CD4<sup>+</sup> T Zellen nachgewiesen werden, unabhängig davon ob die Zellen über den TLR3- oder den TZR-Signalweg stimuliert wurden. Durch Stimulation des Typ I IFN Rezeptors werden STATs phosphoryliert und dadurch aktiviert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Westernblotanalysen durchgeführt, um die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT1 und STAT3 zu untersuchen.

Zudem sollte durch diesen Versuchsansatz analysiert werden, ob CD4<sup>+</sup> T Zellen nach TLR3 Stimulation kleine Mengen Typ I IFN produzierten, deren Konzentration zu gering war um sie mit ELISA nachweisen zu können, bzw. ob Typ I IFN direkt von CD4<sup>+</sup> T Zellen gebunden wird und daher nicht mehr nachweisbar war.



**Abb. 5.15: Phosphorylierung von STAT1 und 3 nach Stimulation mit dem Überstand vorinkubierter CD4<sup>+</sup> T Zellen.** Die Zellen wurden mit Medium (Med.→) oder poly(I:C) (pIC→) über 20 Stunden vorinkubiert, gewaschen und für 150 Minuten (A-D) oder 24 Stunden (E-H) in Medium kultiviert (→ Med.) oder über den TZR und CD28 stimuliert (→  $\alpha$ CD3/CD28). Mit dem Überstand aus dieser Stimulation wurden für 2 Stunden CD4<sup>+</sup> T Zellen inkubiert und die Phosphorylierung von STAT1 (Abb. A) und STAT3 (Abb. B) untersucht.

Für diesen Versuch wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) stimuliert oder in Medium inkubiert und danach gewaschen um das poly(I:C) zu entfernen. Die vorinkubierten Zellen wurden dann in Medium oder mit einem zusätzlichen TZR/CD28 Stimulus inkubiert. Mit dem Überstand dieser Inkubation wurden nun erneut CD4<sup>+</sup> T Zellen desselben Spenders entweder für 150 Minuten oder 24 Stunden stimuliert und anschließend mittels Westernblot analysiert.

Der Überstand von lediglich in Medium inkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen induzierte unabhängig von der Dauer der Stimulation keine Phosphorylierung von STAT1 und 3 (Abb. 5.15 A/B, Probe A und E). Der Überstand von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) inkubiert wurden, löste unabhängig von der Stimulationsdauer die Phosphorylierung beider Signalmoleküle aus (Abb. 5.15, Probe B und F). Poly(I:C) Inkubation führte folglich zur Sezernierung von Molekülen, die STAT1/3 Signalwege aktivierten. Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit dem Überstand von Medium vorinkubierten, anschließend TZR/CD28 stimulierten Zellen, führte nach 24-stündiger, jedoch nicht nach 150-minütiger Stimulation zur Phosphorylierung der beiden untersuchten Transkriptionsfaktoren (Abb. 5.15, Probe G und C).

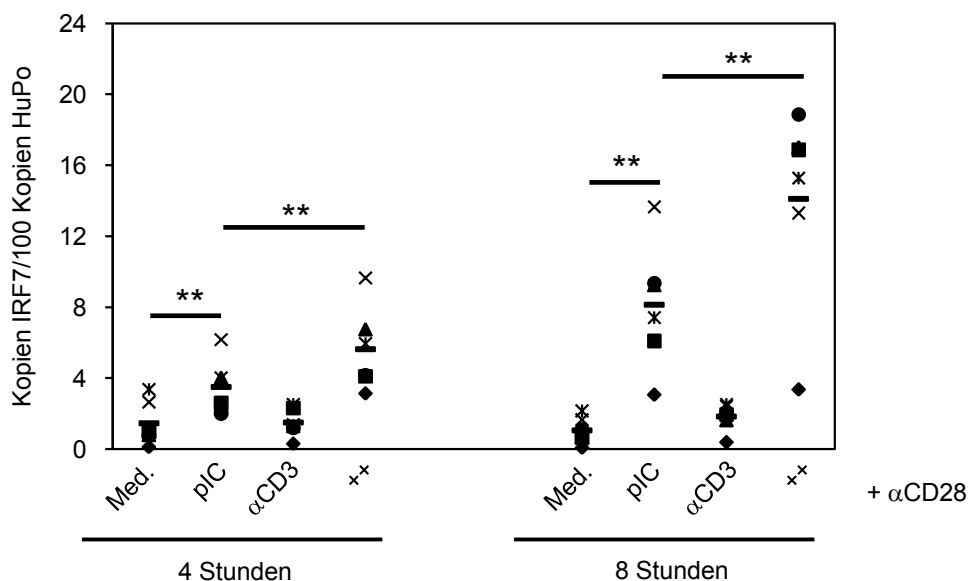
CD4<sup>+</sup> T Zellen die mit dem Überstand von CD4<sup>+</sup> T Zellen die sowohl mit poly(I:C) vorinkubiert, als auch über TZR/CD28 stimuliert wurden, wiesen die stärkste Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 auf.

Nach der Stimulation von TLR3 in CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde vermutlich die Sezernierung von Molekülen induziert, die wiederum STAT1 und STAT3 Phosphorylierung auslösten. Ein ähnlicher, wenn auch schwächerer Effekt konnte nach Stimulation des TZR Signalwegs beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für das Phosphorylierungsprofil von STAT1 und

STAT3 war die Expression von Typ-I IFN, die durch den Transkriptionsfaktor IRF3 vermittelt wird.

IRF3 wird ähnlich wie NF- $\kappa$ B durch Phosphorylierung aktiviert. Initial wurden auch für IRF3 Westernblotanalysen durchgeführt, um den Phosphorylierungsstatus von IRF3 und somit seine Aktivierung zu untersuchen. Es gelang nicht unterschiedliche Phosphorylierungszustände von IRF3 in Abhängigkeit von poly(I:C) Stimulation, CD3/CD28 Stimulation und Kombination der Stimuli reproduzierbar nachzuweisen.

Daher wurden qRT-PCR Analysen für die Analyse der IRF3 Aktivität durchgeführt. Hierfür wurden die Expression des Gens *Irf7* analysiert, von dem bekannt ist, dass seine Transkription durch IRF3 reguliert wird.



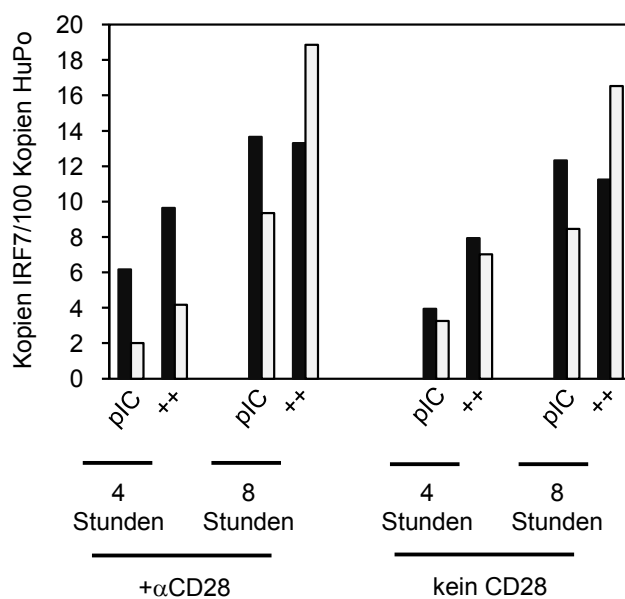
**Abb. 5.16: qRT-PCR Analyse der Expression des IRF3 regulierten Gens *Irf7*.** CD4<sup>+</sup> T Zellen von 6 unterschiedlichen Spendern wurden über TLR3 (pIC), den TZR (αCD3) oder in Kombination (++) stimuliert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch qRT-PCR wurde dann die relative Expression von *Irf7* bezogen auf das Gen *humane polymerase II* (HuPo) ermittelt. Alle Zellen wurden zusätzlich über CD28 stimuliert.

Für die qRT-PCR Analyse wurde eine Kinetik über einen Zeitraum von 0-10 Stunden durchgeführt, wobei alle zwei Stunden Proben genommen wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden lediglich zwei Zeitpunkte gezeigt (Abb. 5.16). Dargestellt ist die Kopienanzahl von *Irf7* pro 100 Kopien des Gens *humane polymerase II* (HuPo), das für primäre CD4<sup>+</sup> T Zellen als Referenzgen verwendet wurde. In unstimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde jeweils eine sehr geringe *Irf7*-Transkriptmenge detektiert. 4-stündige und stärker noch 8-stündige Applikation von poly(I:C) induzierte signifikant die Transkription von *Irf7*. Die TZR Stimulation hatte keinen Einfluss auf die Expression von *Irf7* und somit auf die Aktivität von

IRF3. Eine kombinierte Stimulation über TLR3 und den TZR verstärkte zu beiden Zeitpunkten hoch signifikant die poly(I:C) induzierte Genexpression (Abb. 5.16).

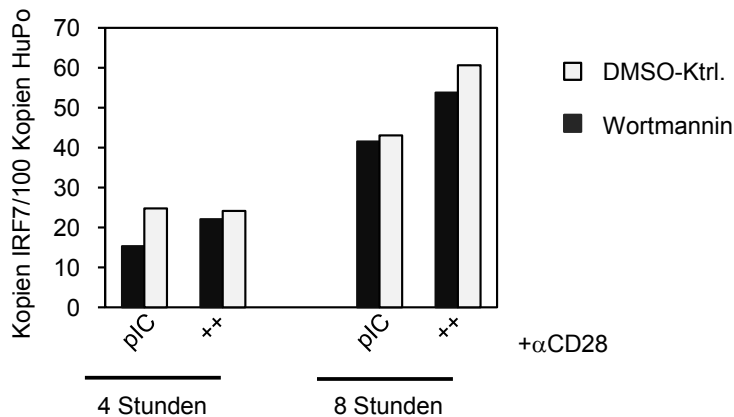
Wurden  $CD4^+$  T Zellen nicht über CD28 kostimuliert, reagierten sie vergleichbar wie mit CD28 Kostimulus. Wie in Abb. 5.17 dargestellt, ist das Expressionsniveau von *Irf7* mit und ohne CD28 Quervernetzung vergleichbar.

Mit der qRT-PCR gelang es erstmals eindeutig einen direkten Effekt der alleinigen TLR3 Stimulation auf T Zellen zu zeigen. Die verstärkte IRF3 Aktivierung nach kombinierter TZR und TLR3 Stimulation erklärt möglicherweise die verstärkte Expression antiviraler Zytokine und Chemokine unter den gleichen Bedingungen.



**Abb. 5.17: qRT-PCR Analyse der Expression des IRF3 regulierten Gens IRF7 in Abhängigkeit von CD28 Kostimulation.** Die Versuchsdurchführung war identisch wie für Abb.5.16 beschrieben, mit der Ausnahme, dass zum Teil (wie in der Graphik angegeben) nicht über CD28 kostimuliert wurde. In der Graphik sind die Ergebnisse von Versuchen mit zwei unabhängigen Spendern wiedergegeben.

Der kostimulatorische Effekt von CD28 auf die T Zellaktivierung wird unter anderem durch Aktivierung des PI3 Kinase Signalwegs vermittelt. Auch über eine Beteiligung der PI3 Kinase in der IRF3 Regulation gibt es, wenn auch widersprüchliche, Publikationen [47, 49] (siehe auch 1.3.2.2). Um die Rolle der PI3-K für die IRF3 Aktivierung, bzw. die Transkription von *Irf7* in  $CD4^+$  T Zellen zu ermitteln, wurden Zellen mit dem PI3-K Inhibitor Wortmannin behandelt und anschließend, wie bei den in Abb. 5.16 geschilderten Experimenten beschrieben, stimuliert.



**Abb. 5.18: qRT-PCR Analyse der Transkription von IRF7 nach PI3-K Inhibition.** Vor Stimulation wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen für 3 Stunden mit Wortmannin behandelt. Die Stimulation der CD4<sup>+</sup> T Zellen erfolgte wie für Abb. 5.16 beschrieben. Dargestellt ist ein representatives Experiment.

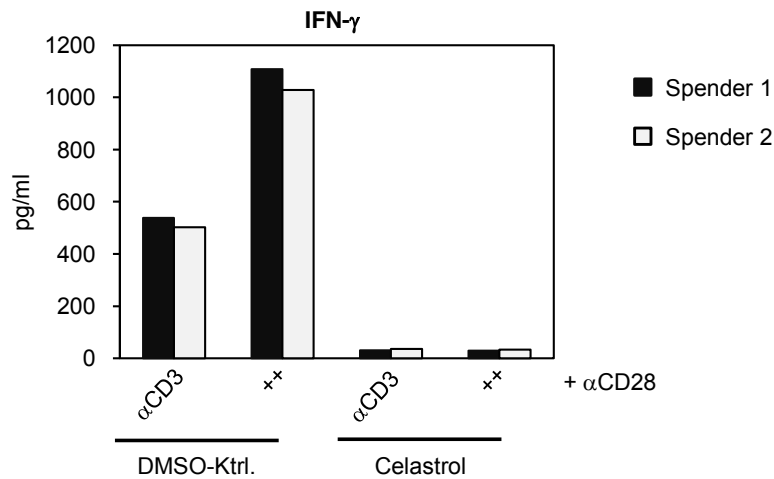
Die Inhibition der PI3 Kinase hatte nur einen äußerst schwachen Einfluss auf die IRF3 Aktivität, bzw. die Transkription von *Irf7* (Abb. 5.18).

## 5.6 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist von großer Bedeutung für die transkriptionelle Regulation zahlreicher Gene in Zusammenhang sowohl mit der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. Die Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine beruht neben weiteren Faktoren auf der Aktivität von NF-κB. Darüber hinaus kann NF-κB sowohl durch den TZR- als auch durch den TLR3-Signalweg aktiviert werden (siehe Einleitung). Daher wurde die Aktivität von NF-κB eingehend analysiert.

### 5.6.1 Inhibition von NF-κB unterbindet die IFN-γ Expression

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde initial die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF-κB für die Expression von IFN-γ durch Experimente mit dem NF-κB Inhibitor Celastrol untersucht. CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden nach 6-stündiger Vorinkubation mit Celastrol für 24 Stunden über den TZR/CD28 stimuliert sowie über TLR3 kostimuliert. Die IFN-γ Konzentration in den Überständen der Zellkultur wurde mittels ELISA bestimmt.



**Abb. 5.19: Unterdrückung der IFN- $\gamma$  Expression durch den NF- $\kappa$ B Inhibitor Celastrol.**  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen/ml wurden für 6 Stunden mit Celastrol oder als Kontrolle mit DMSO inkubiert, gewaschen und für 20 Stunden mit 2  $\mu$ g/ml antiCD3 mAk oder zusätzlich mit poly(I:C) (++) stimuliert. Die IFN- $\gamma$  Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt.

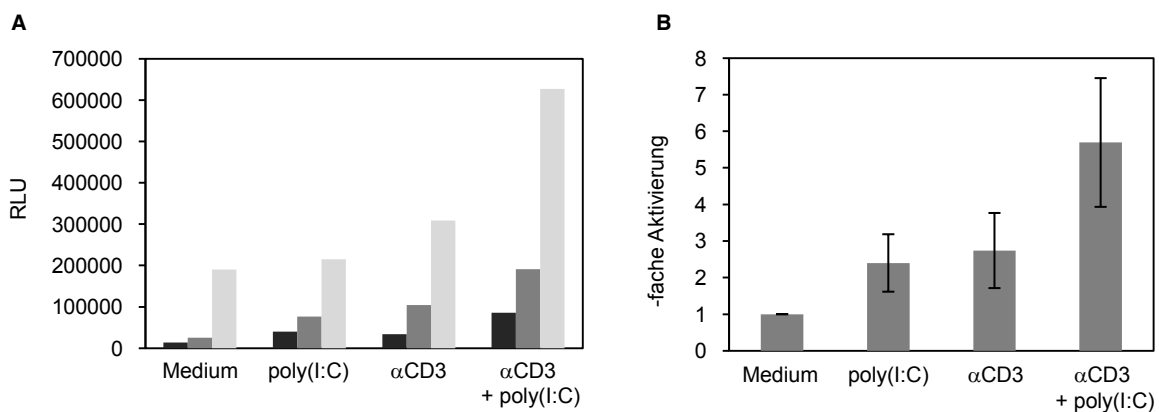
Die in der DMSO Lösungsmittel-Kontrolle vorinkubierten Zellen reagierten auf CD3/CD28 Kreuzvernetzung mit der Produktion von IFN- $\gamma$ . Kostimulation mit poly(I:C) (++) erhöhte die IFN- $\gamma$  Konzentration im Überstand der Zellkultur (Abb. 5.19, links). Die Celastrol Behandlung inhibierte die TZR/CD28 induzierte IFN- $\gamma$  Sezernierung vollständig. Die in der DMSO-Kontrolle deutlich verstärkte IFN- $\gamma$  Expression nach TLR3 Kostimulation war ebenfalls vollständig unterbunden (Abb. 5.19, rechts). NF- $\kappa$ B Aktivität war also Voraussetzung für die Expression von IFN- $\gamma$ . Ob auch der TLR3 vermittelte, kostimulatorische Effekt durch NF- $\kappa$ B vermittelt wurde ließ sich durch dieses Experiment nicht beantworten.

#### 5.6.2 TLR3 Stimulation erhöht die TZR induzierte NF- $\kappa$ B Aktivität in Jurkat Zellen

Zur Quantifizierung der NF- $\kappa$ B Aktivität stand ein Luciferase Konstrukt zur Verfügung. Dieses umfasste das Luciferase codierende Gen, dessen Promotor zahlreiche NF- $\kappa$ B Bindestellen beinhaltete. Die Menge des exprimierten Enzyms ließ sich nach Lyse der transfizierten Zellen und Zugabe des Luciferase Substrats Luciferin quantifizieren. Die bei der Umsetzung des Substrats auftretende Luminiszenz war abhängig von der Menge des Enzyms, die wiederum von der Transkriptionsrate und somit von der Aktivität von NF- $\kappa$ B abhing. Für initiale Versuche mit dem Reporter Konstrukt wurde mit Jurkat Zellen, einer gut charakterisierten, CD4<sup>+</sup> positiven leukämischen T Zelllinie, gearbeitet. Jurkat Zellen wurden

verwendet, da gezeigt werden konnte, dass sie TLR3 exprimierten (Abb. 5.3 und 5.4). Desweiteren wird, wie in primären CD4<sup>+</sup> T Zellen, nach TLR3 Kostimulation verstärkt CD69 auf der Zelloberfläche exprimiert (Daten nicht gezeigt). Ferner waren Jurkat Zellen im Vergleich zu primären CD4<sup>+</sup> T Zellen leichter zu transfizieren.

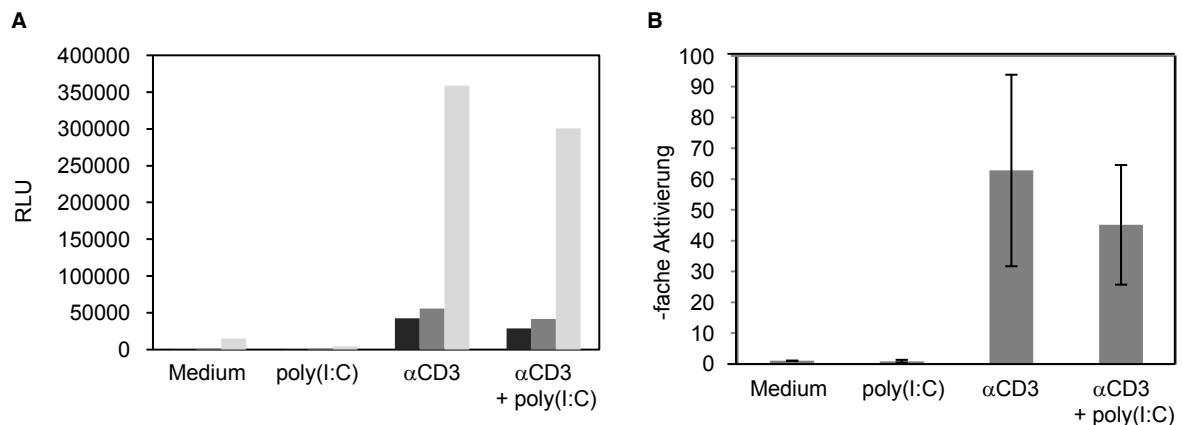
Jurkat Zellen wurden mit dem Luciferase Reporter Konstrukt transfiziert und anschließend mit poly(I:C), dem agonistischen anti-CD3 mAk OKT3 oder beiden stimuliert. Das NF- $\kappa$ B Luciferase Konstrukt wurde in zwei von drei Versuchen durch poly(I:C) Stimulation leicht induziert (Abb. 5.20 A). Stimulation des TLR Signalwegs durch  $\alpha$ CD3 Antikörper führte im Vergleich zu einer stärkeren Aktivität. Eine kombinierte Stimulation über CD3 und TLR3 hatte einen synergistischen Effekt und verstärkte die NF- $\kappa$ B Aktivität deutlich (Abb. 5.20 A/B).



**Abb. 5.20: Aktivität eines NF $\kappa$ B Luciferase Konstrukts in Jurkat Zellen.** Nach Transfektion des Luciferase Konstrukts wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend für 16 Stunden mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C), 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk, oder einer Kombination beider Stimuli inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde Luciferin zugegeben und die auftretende Luminiszenz quantifiziert. A: Relative light units (RLU) gemessen nach drei unabhängigen Transfektionen des Konstrukts. B): Darstellung der x-fachen Aktivierung des Reportergenkonstrukts bei den in A) dargestellten Experimenten. Der Mediumwert wurde gleich 1 gesetzt.

Neben dem NF- $\kappa$ B Reportergen Konstrukt wurden auch Reportergen Konstrukte für IRF3, RE/AP und NFAT verwendet. Unabhängig vom Stimulus lieferten Versuche mit dem IRF3 und dem RE/AP Konstrukt keinerlei Hinweise auf Aktivität der jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Mit dem NFAT Reportergenkonstrukt konnten dagegen reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

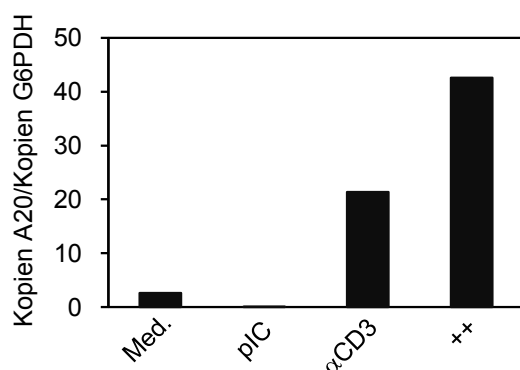




**Abb. 5.21: Aktivität eines NFAT Luciferase Konstrukts in Jurkat Zellen.** Die Durchführung der Experimente erfolgte wie unter Abb. 5.20 beschrieben. A): Relative light units (RLU) gemessen nach drei unabhängigen Transfektionen des Konstrukts. B) Darstellung der x-fachen Aktivierung des Reportergenkonstrukts bei den in A) dargestellten Experimenten. Der Mediumwert wurde gleich 1 gesetzt.

NFAT Aktivität war in Jurkat Zellen ohne Stimulierung des TZR Signalwegs nicht nachweisbar. Nach Kreuzvernetzung von CD3 kam es zu einer ausgeprägten NFAT Aktivierung. Ein zusätzlicher poly(I:C) Stimulus hatte keinerlei verstärkenden Einfluss, sondern verringerte die Luciferase-Aktivität eher, wobei dieser Effekt nicht signifikant war (Abb. 5.21 A/B).

NF- $\kappa$ B ist bei der Regulation zahlreicher Gene beteiligt, die von zentraler Bedeutung für die adäquate Regulation der Immunantwort sind. Indirekt lässt sich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren über Transkriptionsraten der von ihnen regulierten Gene nachweisen. Im Fall von NF- $\kappa$ B wurde die Transkription des Gens *A20* untersucht. Als Referenz diente die Transkription des Gens für die *Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase* (G6PDH).



**Abb. 5.22: qRT-PCR Analyse der Expression des durch NF- $\kappa$ B regulierten Gens A20.** Jurkat Zellen wurden für 8 Stunden über TLR3, den TZR oder in Kombination stimuliert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR wurde dann die relative Expression des Zielgens bezogen auf das Gen *Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase* (G6PDH) ermittelt.

Die Regulation der *A20* Transkription in Jurkat Zellen war vergleichbar mit der Regulation der Luciferaseexpression durch das NF- $\kappa$ B Reportergenkonstrukt. Die *A20* Transkription wurde zwar nicht durch poly(I:C) allein induziert, es ließ sich jedoch eine starke Induktion durch Stimulation mit anti-CD3 mAk nachweisen, die durch zusätzliche Stimulation über TLR3 deutlich verstärkt wurde (Abb. 5.22). TLR3 Kostimulation bewirkte somit eine Steigerung der über den TLR Signalweg induzierten NF- $\kappa$ B Aktivität. TLR3 Stimulation alleine hat allenfalls einen geringen Einfluss auf NF- $\kappa$ B.

### 5.6.3 Auswirkungen der TLR3 Stimulation auf die Transkription von NF- $\kappa$ B regulierten Genen in primären CD4<sup>+</sup> T Zellen

Ergebnisse mit leukämischen Zelllinien wie Jurkat sind nicht unbedingt repräsentativ für primäre „normale“ T Zellen. Daher war es erforderlich, die in Experimenten mit Jurkat Zellen erhaltenen Ergebnisse in primären CD4<sup>+</sup> T Zellen zu überprüfen.

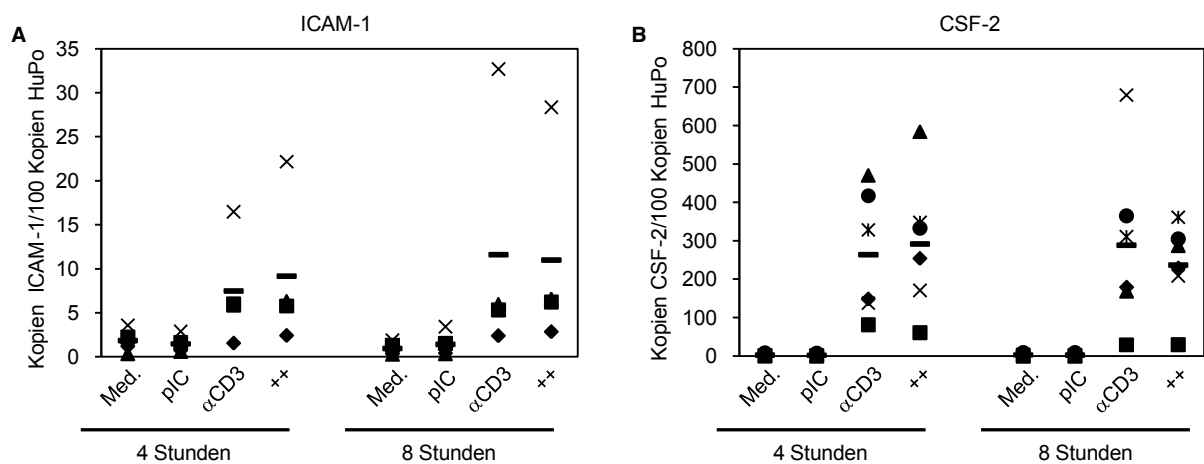
Luciferase Reportergen Experimente mit primären CD4<sup>+</sup> T Zellen führten jedoch zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Vitalität der primären CD4<sup>+</sup> T Zellen waren deutlich geringer als in Versuchen mit Jurkat Zellen. Auch die qRT-PCR Analyse der *A20* Transkription lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse, da die Transkription dieses Gens sehr stark zwischen verschiedenen Spendern variierte.

Neben *A20* wurden jedoch die qRT-PCR für weitere Gene etabliert, deren Regulation ebenfalls als abhängig von NF- $\kappa$ B beschrieben wurde, darunter *Icam-1* und *Csf-2*.

In Abb. 5.23 dargestellt, ist die Kopienanzahl von *Icam-1* und *Csf-2* pro 100 Kopien des Gens *humane polymerase II* (HuPo). Die Stimulation von TLR3 alleine aktivierte weder die Transkription von *Icam-1* noch von *Csf-2*. Stimulation des TLR Signalwegs in Kombination mit CD28 erhöhte die Transkriptionsrate der beiden durch NF- $\kappa$ B regulierten Gene sowohl nach 4 als auch nach 8 Stunden, wobei die Transkriptionsrate von *Icam-1* (Abb. 5.23, links) deutlich geringer war als für *Csf-2* (Abb. 5.23, rechts). Zwischen den verschiedenen Spendern gab es auch bei diesen beiden Genen deutliche Unterschiede in der Expression. Diese Spender abhängige Variabilität zeigte sich auch nach zusätzlicher Stimulation mit poly(I:C). So verstärkte poly(I:C) Kostimulation bei einigen Spendern die TLR/CD28 induzierte Transkription, während sie bei anderen Spendern erniedrigt wurde. Die Mittelwerte der *Icam-1* Transkription nach TLR/CD28 und nach zusätzlicher TLR3 Stimulation unterschieden sich nur geringfügig (Abb. 5.23, links). Der Mittelwert der durch CD3/CD28 Kreuzvernetzung induzierten *Csf-2* Transkription wurde durch poly(I:C) Kostimulation nach 4-stündiger Stimulation leicht erhöht, nach 8-stündiger Stimulation leicht erniedrigt (Abb. 5.23,

rechts). Die Unterschiede waren jedoch auch hier nicht signifikant und die Variabilität zwischen Zellen verschiedener Testpersonen sehr ausgeprägt, was unter Umständen auf Vorerkrankungen der Testpersonen und damit unterschiedlicher Regulation der Gentranskription zurückzuführen war. Ein eindeutiger kostimulatorischer Effekt von poly(I:C) konnte nicht gezeigt werden.

Neben den Transkriptionsraten von *Csf-2* und *Icam-1* wurden auch die von *Bcl2l1*, *Egr* und *Fos* als Indikator für die NF- $\kappa$ B Aktivität untersucht (Daten nicht gezeigt), erwiesen sich aber aus verschiedenen Gründen als nicht verwertbar. Für *Bcl2l1* konnte keinerlei Regulation gezeigt werden. Auch für die Regulation der Expression von *Fos* und *Egr* ließ sich keine eindeutige Aussage treffen, sodass die Transkriptionsrate dieser Gene nicht eingehender untersucht wurde.



**Abb. 5.23: qRT-PCR Analyse der Transkription von *Icam-1* und *Csf-2*.** Primäre CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden über TLR3, den TZR oder kombiniert stimuliert. Kostimulation über CD28 erfolgte in allen Ansätzen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch qRT-PCR wurde dann die relative Expression der Zielgene, bezogen auf das Gen *Human Polymerase II* (HuPo), ermittelt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, Mittelwerte sind als Balken dargestellt.

#### 5.6.4 Westernblotanalyse der NF- $\kappa$ B Aktivierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen

Die Analyse der NF- $\kappa$ B Aktivität durch qRT-PCR lieferte keine eindeutigen Ergebnisse, daher wurden zusätzlich Westernblot Analysen durchgeführt.

Ähnlich wie bei der Untersuchung der NF- $\kappa$ B Aktivität durch qRT-PCR (siehe 5.6.3) wiesen die Ergebnisse der Westernblot Analysen eine recht große Variabilität zwischen verschiedenen Spendern auf. Der deutliche kostimulatorische Effekt von poly(I:C) auf die TZR vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, der für Jurkat Zellen gezeigt wurde (siehe 5.6.2),

konnte in so eindeutiger Form nicht reproduziert werden. Aus diesem Grund wurden die Stimulationsbedingungen verändert, um einen möglichen kostimulatorischen Effekt von poly(I:C) auf die NF- $\kappa$ B Aktivität in CD4<sup>+</sup> T Zellen zu verstärken und besser nachweisen zu können.

Grundlage für die veränderten Stimulationsbedingungen mit dem TLR3-Liganden poly(I:C) waren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, nach denen die Art der TLR2-Liganden Stimulation maßgeblich für das suppressive Verhalten von Treg war. Die direkte Stimulation der Treg über den TZR in Kombination mit TLR2 Liganden induzierte eine geringfügige Verstärkung der Zytokinproduktion und Proliferation, aber keine Aufhebung der Suppression [9]. Die Vorinkubation der Treg mit den TLR2 Liganden und die nachfolgende Stimulation des TZR hatte einen signifikanten Effekt auf die Aufhebung der Suppression.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimenten, in denen die Zellen gleichzeitig über TLR3 und den TZR stimuliert wurden, wurden daher weitere Experimente mit poly(I:C) vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen durchgeführt, um zu untersuchen, ob der kostimulatorische Effekt von TLR3 ausgeprägter nach Vorinkubation war bzw. die CD4<sup>+</sup> T Zellreaktion durch abweichenden Stimulationsmodi maßgeblich verändert wurde.

Dafür wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen:

- für 20 Stunden in Medium (Med. →) oder mit poly(I:C) (pIC →) im Brutschrank vorinkubiert und anschließend über den TZR mit und ohne CD28 Kostimulus stimuliert (Vorinkubation).
- oder wie für die unter 5.6.3 beschriebenen Experimente nach der Isolation für 20 Stunden bei 4°C gelagert und dann parallel zur TZR (+/- CD28 Kostimulus) mit poly(I:C) stimuliert (Kostimulation).

Der Nachweis der Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgte hier über die Analyse des Phosphorylierungsgrads von NF- $\kappa$ Bp65 an Serin 536 sowie der Degradation des Inhibitors von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ . Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  führt zu dessen Degradation und ermöglicht so die Kerntranslokation von NF- $\kappa$ B.

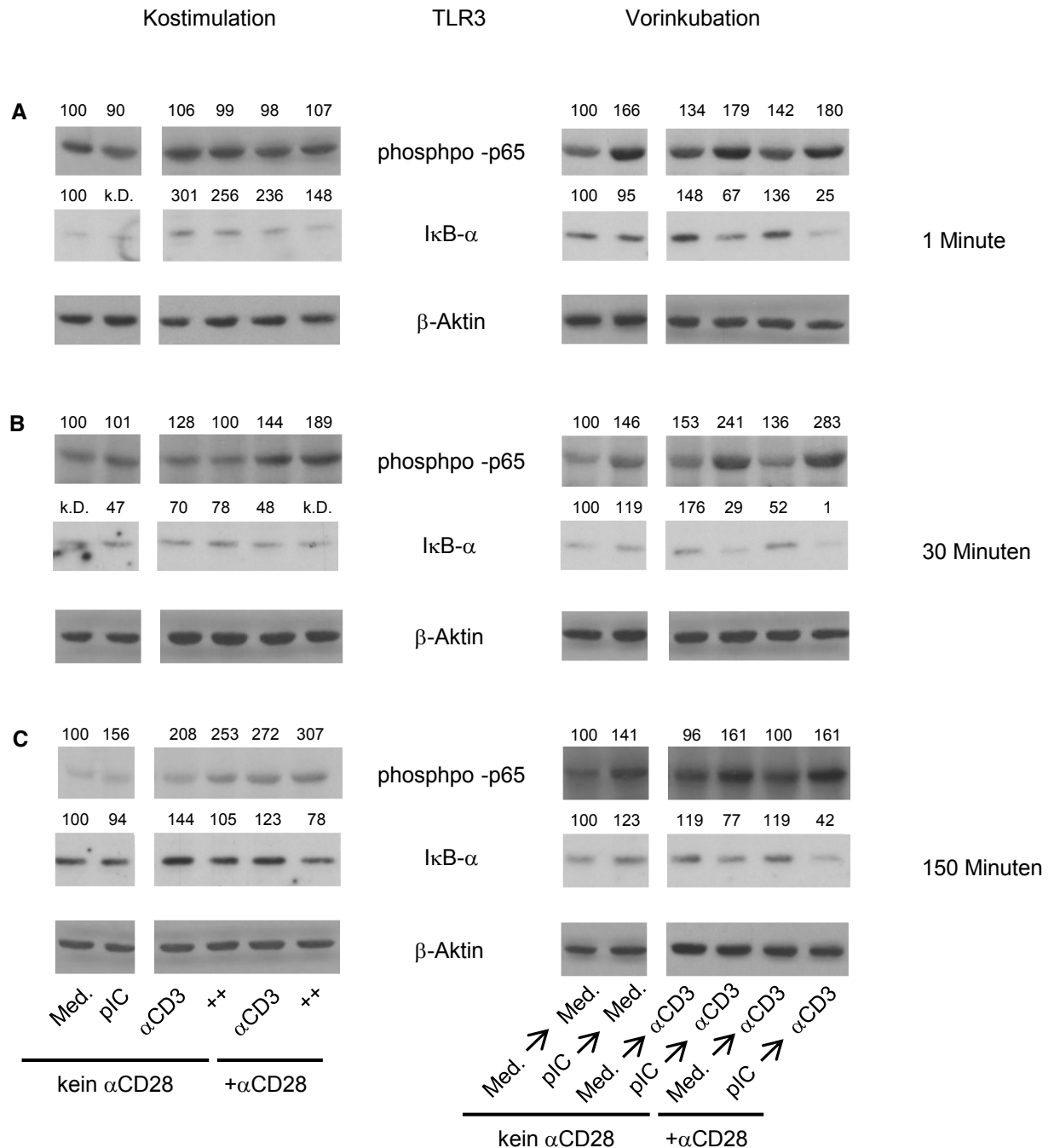
Bei kostimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen war nach einer Stimulationsdauer von einer Minute die Phosphorylierung an p65 in Zellen, die durch CD3 Quervernetzung stimuliert wurden ähnlich stark, wie in Zellen die in Medium kultiviert wurden (Abb. 5.24 A, links). Dieser unerwartete Befund war auf eine umfassende Phosphorylierung an p65 unabhängig vom Stimulus zurückzuführen. Ein eindeutiger Einfluss von poly(I:C) ließ sich nicht erkennen (Abb. 5.24 A, links). Nach 30 Minuten war die Stimulus unabhängige Phosphorylierung abgeklungen, eine verstärkte p65 Phosphorylierung ließ sich in Zellen nachweisen, die durch Kreuzvernetzung

von CD3 und CD28 stimuliert wurden (Abb. 5.24 B, links). Anti-CD3 Stimulation alleine führte zu diesem Zeitpunkt nicht zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung. Stimulation mit poly(I:C) hatte einen leicht verstärkenden Einfluss auf die p65 Phosphorylierung in anti-CD3 und anti-CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen. Nach einer Stimulationsdauer von 150 Minuten war die p65 Phosphorylierung in anti-CD3 und anti-CD3/CD28 stimulierten Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle (Med.) verstärkt. Poly(I:C) Kostimulation bewirkte sowohl nach CD3-, als auch nach CD3/CD28-Quervernetzung eine leicht verstärkte p65 Phosphorylierung (Abb. 5.24 C, links).

Auch auf die Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  hatte poly(I:C) Kostimulation einen Einfluss. Nach ein- und 150-minütiger Stimulation war eine erhöhte Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$  in anti-CD3 und anti-CD3/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen zu erkennen, die über poly(I:C) kostimuliert wurden. Der kostimulatorische Effekt von poly(I:C) war ausgeprägter in Zellen, die zusätzlich über CD28 kostimuliert wurden im Vergleich zu Zellen, die nur über den TZR Signalweg aktiviert wurden (Abb. 5.24 A und C, links). Für eine Stimulationsdauer von 30 Minuten ließ sich auf Grund der Qualität der I $\kappa$ B- $\alpha$  Detektion keine densitometrische Analyse durchführen. (Abb. 5.24 B, links).

Wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) vorinkubiert, ließ sich im Vergleich zu Medium vorinkubierten T Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine verstärkte NF- $\kappa$ Bp65 Phosphorylierung zeigen (Abb. 5.24, rechts). Für die Induktion der Phosphorylierung war die Vorinkubation mit poly(I:C) hinreichend. Wurde mit anti-CD3 mAk stimuliert resultierte das in intensiver p65 Phosphorylierung, Kostimulation über CD28 hatte keine sichtbaren Auswirkungen. Poly(I:C) Vorinkubation verstärkte unter diesen Voraussetzungen die durch CD3-Kreuzvernetzung induzierte Phosphorylierung nochmals. Die I $\kappa$ B- $\alpha$  Degradation wurde durch poly(I:C) Vorinkubation alleine nicht verstärkt. Wurde jedoch zusätzlich mit anti-CD3-mAk stimuliert, so führte dies zu allen untersuchten Zeitpunkten zu einem verstärkten Abbau von I $\kappa$ B- $\alpha$  in poly(I:C) vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen im Vergleich zu in Medium vorinkubierten Zellen. CD28 Kostimulation steigerte die I $\kappa$ B- $\alpha$  Degradation in poly(I:C) und anti-CD3 mAk stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen nochmals (Abb. 5.24, rechts).

Es traten also deutliche Unterschiede in der NF- $\kappa$ B Aktivierung zwischen TLR3 kostimulierten und vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen auf. Nach Vorinkubation waren die Auswirkungen von poly(I:C) ausgeprägter als nach Kostimulation.



**Abb. 5.24: Westernblot Analyse der NF- $\kappa$ Bp65 Phosphorylierung an Serin 536 und I $\kappa$ B- $\alpha$  Degradierung.** Pro Stimulation wurden  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen direkt mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC), 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk ( $\alpha$ CD3), 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk alleine oder in verschiedenen Kombinationen wie angegeben stimuliert (links). Alternativ wurden die Zellen in Medium (Med. $\rightarrow$ ) oder mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC $\rightarrow$ ) für 20 Stunden vorinkubiert und anschließend 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk in Kombination mit ( $\rightarrow\alpha$ CD3/CD28) und ohne ( $\rightarrow\alpha$ CD3) 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28 Antikörper stimuliert (rechts). Die Zellen wurden lysiert und durch Westernblot-Versuche analysiert. Phosphoryliertes NF- $\kappa$ Bp65 sowie I $\kappa$ B- $\alpha$  wurden mittels Antikörpern des Klon 93H1 bzw. 44D4 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Aktin. Die Ziffern geben die Resultate der densitometrischen Analyse an, die wie im Ergebnisteil beschrieben, durchgeführt wurde.

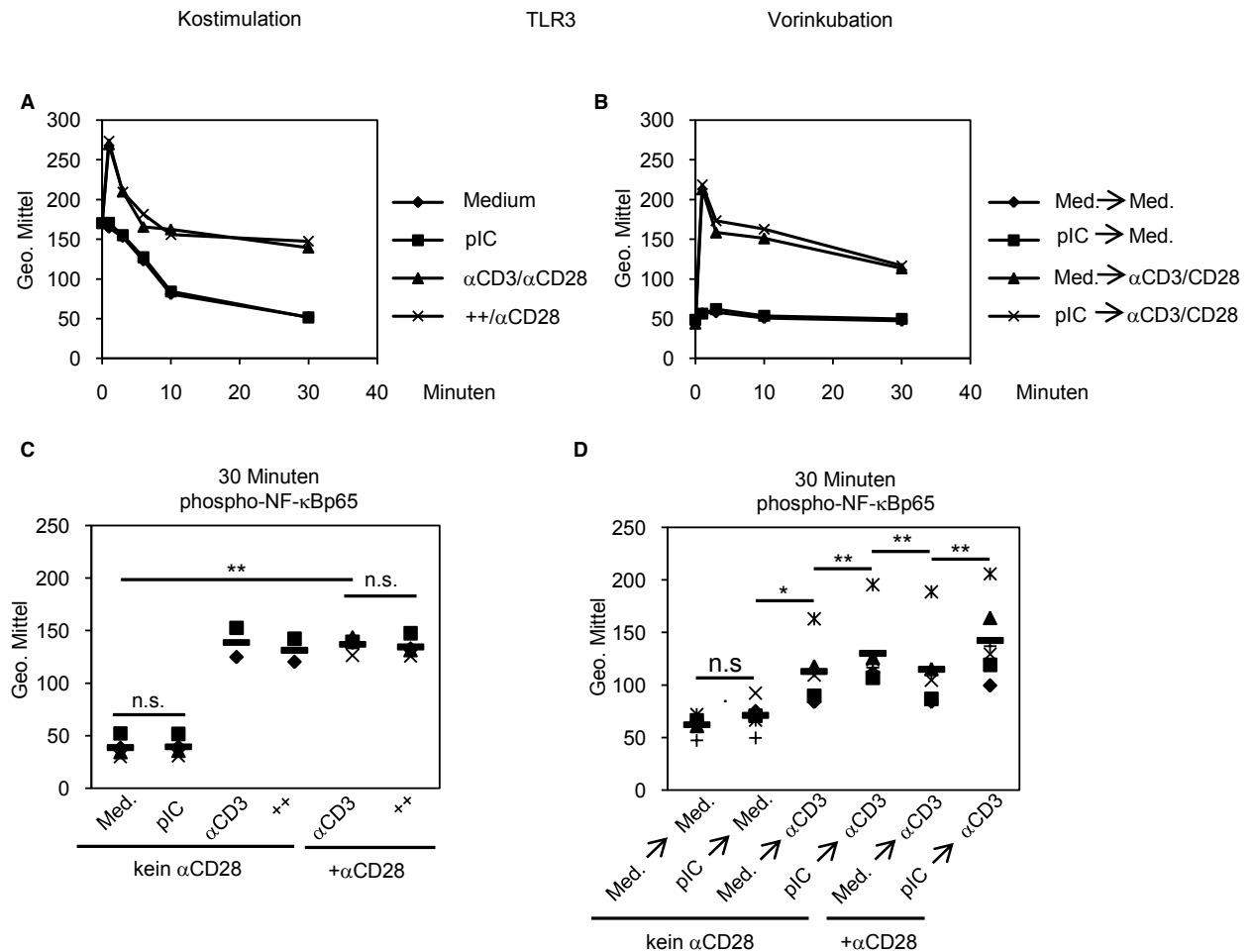
#### 5.6.5 Untersuchung der NF- $\kappa$ Bp65 Phosphorylierung an Serin 529

Um die Westernblot Ergebnisse zu verifizieren, wurden Experimente mit der Phosflow™-Methode durchgeführt. Hierfür wurden primäre CD4<sup>+</sup> T Zellen nach der Stimulation fixiert, permeabilisiert und phosphoryliertes NF- $\kappa$ Bp65 mit einem Fluorophor gekoppelten Antikörper markiert. Hierdurch ließ sich auf Einzelzellebene der Phosphorylierungsgrad bestimmen. Der für die Phosflow™ Methode verwendete Antikörper erkennt p65 Phosphorylierung an Serin 529, der für die Westernblotanalyse eingesetzte Antikörper dagegen phosphoryliertes Serin 536.

Die Resultate der Phosflow™-Untersuchungen bestätigten zum Teil die Ergebnisse der Westernblot-Analyse, lieferten aber auch abweichende Resultate.

Aus den unter Abb. 5.25 A und B dargestellten Kinetiken ist ersichtlich, dass die NF- $\kappa$ B Aktivität bzw. p65 Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen durch Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk induziert wurde. Nach einminütiger Aktivierung erreichte die p65 Phosphorylierung einen Höchststand, fiel nach drei Minuten leicht ab und erreichte nach 6 Minuten ein Niveau, das auch nach 30 Minuten annähernd unverändert blieb (Abb. 5.25 A/B). TLR3 Kostimulation hatte innerhalb dieses Zeitraums keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad (Abb. 5.25 A, C). Weder poly(I:C) alleine, noch in Kombination mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk Stimulation, induzierte eine verstärkte p65 Phosphorylierung im Vergleich zu Medium bzw. CD3/CD28 stimulierten Zellen (Abb. 5.25 A, C). Ähnlich wie bei den in Abb. 5.24 dargestellten Ergebnissen war auch mit Phosflow™ bei CD4<sup>+</sup> T Zellen, die für die Kostimulation mit poly(I:C) eingesetzt wurden, eine unspezifische p65 Phosphorylierung nachweisbar (Abb. 5.25 A). So war zu Beginn der Stimulation auch in nicht über den TZR stimulierten Zellen eine verstärkte p65 Phosphorylierung nachweisbar, die jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war, als die Phosphorylierung nach Kreuzvernetzung von CD3 und CD28 (Abb. 5.25 A).

In vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen ließ sich verstärkte p65 Phosphorylierung ohne CD3/CD28 Kreuzvernetzung nicht nachweisen (Abb. 5.25 B). Es war also davon auszugehen, dass diese Stimulus unabhängige Phosphorylierung auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen war. Eine mögliche Ursache war die Temperaturdifferenz, der kostimulierte CD4<sup>+</sup>T Zellen zu Beginn der Stimulation ausgesetzt waren. Anders als die präinkubierten Zellen wurden sie bei 4°C gelagert und für den Versuch auf 37°C überführt.



**Abb. 5.25: Phosflow™ Analyse der p65 Phosphorylierung.** Pro Stimulation wurden  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen direkt mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C), 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk, 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk alleine oder in verschiedenen Kombinationen wie angegeben stimuliert (links). Alternativ wurden die Zellen in Medium (Med. $\rightarrow$ ) oder mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC $\rightarrow$ ) für 20 Stunden vorinkubiert und anschließend mit 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 mAk in Kombination mit ( $\rightarrow$  $\alpha$ CD3/CD28) und ohne 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk ( $\rightarrow$  $\alpha$ CD3) stimuliert (rechts). Die Zellen wurden permeabilisiert und phosphoryliertes NF- $\kappa$ Bp65 mit einem Fluorophor gekoppelten Antikörper markiert. (A/B) Zeitverlauf der p65 Phosphorylierung bei einem Spender. (C/D) p65 Phosphorylierung nach 30 Minuten bei 5 Spendern. Dargestellt sind jeweils die geometrischen Mittel der Fluoreszenz der untersuchten Zellpopulationen. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, Mittelwerte sind als Balken dargestellt. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) angegeben.

Im Brutschrank präinkubierte Zellen wiesen keine erhöhte basale p65 Phosphorylierung auf. Ohne Stimulation des TLR Signalwegs veränderte sich sowohl in Medium vorinkubierten als auch mit poly(I:C) vorinkubierten Zellen der Grad der p65 Phosphorylierung im Zeitverlauf kaum (Abb. 5.25 B). Nach einminütiger Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk ließ sich auch bei vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen die stärkste Phosphorylierung nachweisen, die im weiteren Zeitverlauf zügig wieder abnahm. Zu allen dargestellten Zeitpunkten konnte hier jedoch ein erhöhter Phosphorylierungsgrad in poly(I:C) vorinkubierten gegenüber Medium



vorinkubierten Zellen nach CD3/CD28 Stimulation nachgewiesen werden. Ohne CD3/CD28 Stimulus bewegte sich die p65 Phosphorylierung auf einer basalen Ebene. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen vorinkubierten Zellen waren nicht zu beobachten (Abb. 5.25 B).

Da auch der Phosphorylierungsgrad bei den in Abb. 5.25 A dargestellten, unstimulierten Zellen nach 30 Minuten eine basale Ebene erreicht hatte und da zu diesem Zeitpunkt in den Westernblotanalysen ausgeprägte Unterschiede zu erkennen waren, wurde dieser Zeitpunkt mit der Phosflow™ Methode eingehender untersucht. Wie in Abbildung 5.25 C zu erkennen ist, war es für die p65 Phosphorylierung nach 30 Minuten unerheblich, ob die Zellen parallel zu der Stimulation durch CD3 Kreuzvernetzung über CD28 kostimuliert wurden, dies hatte keinen verstärkenden Effekt. Statistische Aussagen lassen sich in diesem Zusammenhang jedoch nicht treffen, da Phosflow™-Versuchsansätze ohne CD28 Kostimulation lediglich mit zwei Spendern durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse weichen von den oben beschriebenen Westernblot-Versuchen ab (Abb. 5.24), was unter Umständen auf unterschiedliche Epitope der verwendeten anti-NF- $\kappa$ Bp65 Antikörper zurückzuführen ist. Der Westernblot Antikörper erkennt phosphoryliertes Serin 536, der Phosflow™ Antikörper phosphoryliertes Serin 529. Auch bei Analysen mit der Phosflow™ Methode ist kein Unterschied der Phosphorylierung nach anti-CD3 oder anti-CD3/28 mAk Stimulation zwischen TLR3 kostimulierten und nicht kostimulierten Zellen nachweisbar (Abb. 5.25 C).

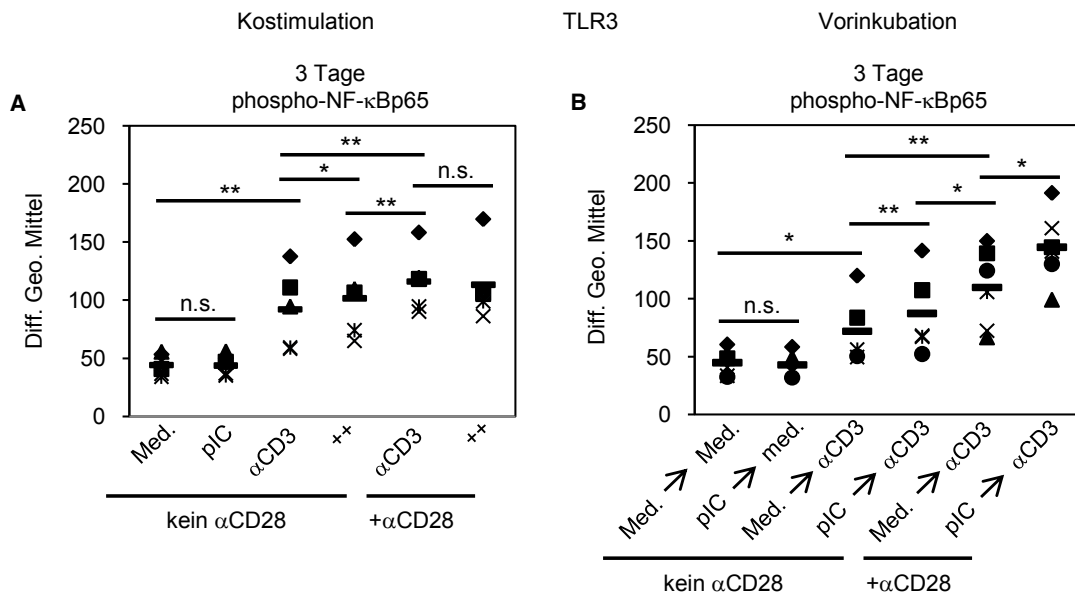
Die Vorinkubation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) bewirkte keine signifikante Zunahme der NF- $\kappa$ B Phosphorylierung an Serin 529 im Vergleich zu Zellen, die in Medium vorinkubiert wurden (Abb. 5.25 D). Auch für diesen Unterschied im Vergleich zu der Westernblotanalyse waren möglicherweise die unterschiedlichen Epitope der Antikörper verantwortlich. Die p65 Phosphorylierung nach anti-CD3 und anti-CD3/CD28 Stimulation war in poly(I:C) vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen signifikant stärker als nach Medium Vorinkubation (Abb. 5.25 D). Nach einer Stimulationsdauer von 30 Minuten hatte die Vorinkubation mit poly(I:C) einen hochsignifikant stärkeren kostimulatorischen Effekt auf die p65 Phosphorylierung als die Kostimulation über CD28 (Abb. 5.25 D).

Generell war nach CD3 und CD28 Kreuzvernetzung für 30 Minuten die p65 Phosphorylierung an Serin 529 in vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen schwächer ausgeprägt, als in direkt stimulierten Zellen.

Nach dreitägiger CD3 Stimulation war die NF- $\kappa$ Bp65 Phosphorylierung deutlich ausgeprägt, jedoch signifikant stärker nach CD3/CD28 Stimulation (Abb. 5.26 A/B). Sowohl die direkte TLR3 Kostimulation (Abb. 5.26 A), als auch die poly(I:C) Vorinkubation (Abb. 5.26 B) verstärkte die p65 Phosphorylierung in mit anti-CD3 mAk stimulierten Zellen, Kostimulation jedoch schwächer als Vorinkubation. Wurden die Zellen zusätzlich zu CD3 auch noch über

CD28 stimuliert, so ließ sich nur in poly(I:C) vorinkubierten eine verstärkte NF- $\kappa$ Bp65 Aktivierung nachweisen. Sowohl nach poly(I:C) Kostimulation, als auch nach poly(I:C) Präinkubation war der kostimulatorische Effekt von poly(I:C) auf die anti-CD3 mAk induzierte p65 Phosphorylierung schwächer, als nach CD28 Kostimulation. Nach eintägiger Stimulation wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet, die Unterschiede in der Phosphorylierung hervorgerufen durch poly(I:C) Präinkubation waren jedoch nicht so ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Anders als bei Kurzzeit- stimulierten Zellen war es bei dreitägiger Stimulation notwendig die gemessene Fluoreszenz der mit dem p65 Antikörper markierten Zellen mit unmarkierten Zellen zu verrechnen, da die Autofluoreszenz von aktivierten Zellen sich über diesen Zeitraum veränderte. Daher sind keine direkten Vergleiche der Werte von Kurzzeit- und Langzeit-stimulierten Zellen möglich.



**Abb. 5.26: Einfluss von poly(I:C) auf die NF- $\kappa$ Bp65 Phosphorylierung nach dreitägiger Stimulation.** Für die Untersuchung wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C), anti-CD3 mAk oder einer Kombination beider Stimuli (++) behandelt (A) oder 20 Stunden in Medium (Med.→) oder mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C) (pIC→) präinkubiert und anschließend über 3 Tage mit 2 $\mu$ g/ml OKT3 ( $\alpha$ CD3) oder Medium stimuliert (B). Sofern angegeben wurde zusätzlich über CD28 kostimuliert. Pro Stimulation und Zeitpunkt wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen mit dem phospho-p65 mAk markiert und am Durchflußzytometer analysiert. Dargestellt ist die Differenz der geometrischen Mittel der Fluoreszenz zwischen Antikörper markierten und unmarkierten Zellen. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, Mittelwerte sind als Balken dargestellt. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) angegeben.

Unterschiede in Bezug auf die Regulation von NF- $\kappa$ B zwischen poly(I:C) vorinkubierten und direkt parallel zum TZR über TLR3 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen konnten auch mit der Phosflow™ Methode gezeigt werden. Präinkubation mit poly(I:C) verstärkte zu allen

untersuchten Zeitpunkten die durch den TZR Signalweg induzierte Phosphorylierung von NF- $\kappa$ Bp65. Der kostimulatorische Effekt war sowohl nach anti-CD3 als auch nach anti-CD3/CD28 Kreuzvernetzung zu beobachten. Wurde TLR3 parallel zum TZR stimuliert ließ sich lediglich nach dreitägiger Stimulation mit anti-CD3 mAk ein verstärkender Effekt zeigen.

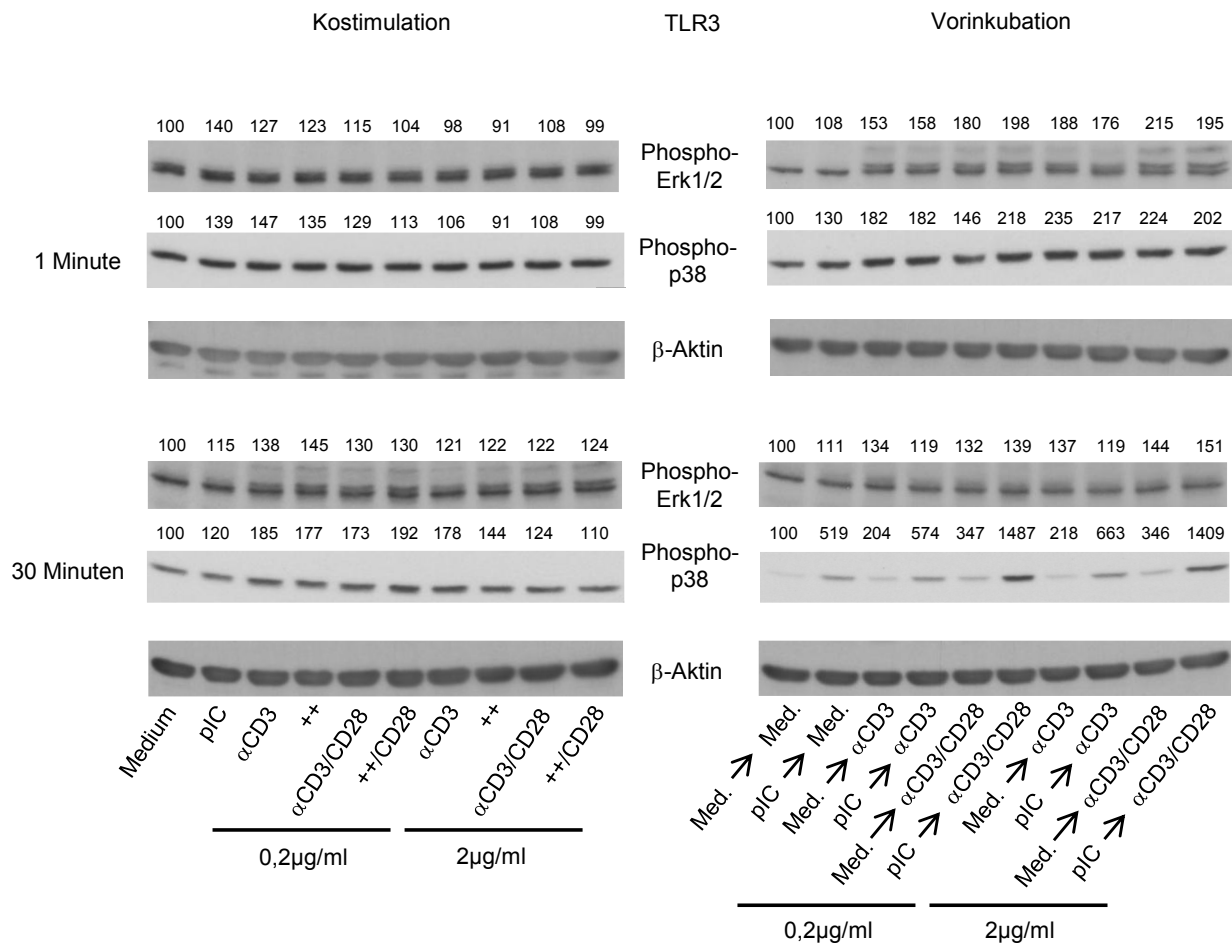
## 5.7 Die MAPKinase Kaskade

Wie für den NF- $\kappa$ B Signalweg so ist auch für die MAPK-Kaskade beschrieben, dass sie sowohl durch Stimulation des TZR als auch durch TLR3 aktiviert werden kann. Die Kaskade mündet in der Phosphorylierung und Aktivierung der MAP Kinasen Erk1/2 und p38, die an der Regulation der Zelldifferenzierung und Proliferation beteiligt sind

ERK1/2 und p38 werden durch die oberhalb in der Signalkaskade liegende MAP Kinase/Erk Kinase (MEK) aktiviert. Wie für NF- $\kappa$ B lässt sich die Aktivierung der beiden Kinasen durch den Nachweis ihrer Phosphorylierung bestimmen. Zu diesem Zweck wurden Westernblotanalysen durchgeführt, die auch einen Vergleich zwischen poly(I:C) vorinkubierten und parallel zum TZR über TLR3 stimulierten Zellen umfassten.

Nach einer Minute ließen sich bei nicht vorinkubierten Zellen keine Unterschiede in der ERK1/2 Phosphorylierung zwischen den unterschiedlich stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen zeigen (Abb. 5.27, links), ERK1/2 lag phosphoryliert vor. Nach 30 Minuten war die charakteristische ERK1 und ERK2 Doppelbande nur bei Zellen zu erkennen, die sowohl mit anti-CD3 als auch mit anti-CD28 mAk stimuliert wurden. Stimulation mit 2  $\mu$ g/ml plattengebundenem anti-CD3 mAk bewirkte erwartungsgemäß eine ausgeprägtere Phosphorylierung, als eine Stimulation mit 1/10 der Antikörper Konzentration. TLR3 Stimulation hatte keinen Einfluss auf die Erk1/2 Phosphorylierung, unabhängig davon ob TLR3 alleine oder in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert wurde (Abb. 5.27, links). Die im Brutschrank vorinkubierten Zellen wiesen nach einminütiger Stimulation ein vergleichbares Erk1/2 Phosphorylierungsmuster auf (Abb. 5.27, rechts). CD3 Quervernetzung aktivierte die beiden Kinasen, verstärkt wurde dieser Effekt durch CD28 Kostimulation. Auch eine Abhängigkeit von der anti-CD3 Antikörperkonzentration ließ sich zeigen. Ob die Zellen mit poly(I:C) oder in Medium vorinkubiert wurden hatte jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität von Erk1/2. Nach einer Stimulationsdauer von 30 Minuten war keine verstärkte Erk1/2 Phosphorylierung mehr nachweisbar (Abb. 5.27, rechts).

Unabhängig von der Art der Stimulation mit poly(I:C) konnte kein Einfluss von TLR3 auf die Aktivität von Erk1/2 gezeigt werden.



**Abb. 5.27: Westernblot Analyse der Erk1/2 Phosphorylierung in TLR3 kostimulierten und vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen.** Pro Stimulation wurden  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen direkt mit 50 µg/ml poly(I:C) (pIC), 0,2 oder 2 µg/ml anti-CD3 mAk (αCD3), 1 µg/ml anti-CD28 mAk alleine oder in verschiedenen Kombinationen wie angegeben stimuliert (links). Alternativ wurden die Zellen in Medium (Med.→) oder mit 50 µg/ml poly(I:C) (pIC→) für 20 Stunden vorinkubiert und anschließend über den angegebenen Zeitraum mit 0,2 oder 2 µg/ml anti-CD3 mAk in Kombination mit (→αCD3/CD28) und ohne (→αCD3) 1 µg/ml anti-CD28 mAk stimuliert (rechts). Die Zellen wurden lysiert und mittels Westernblot analysiert. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von β-Aktin.

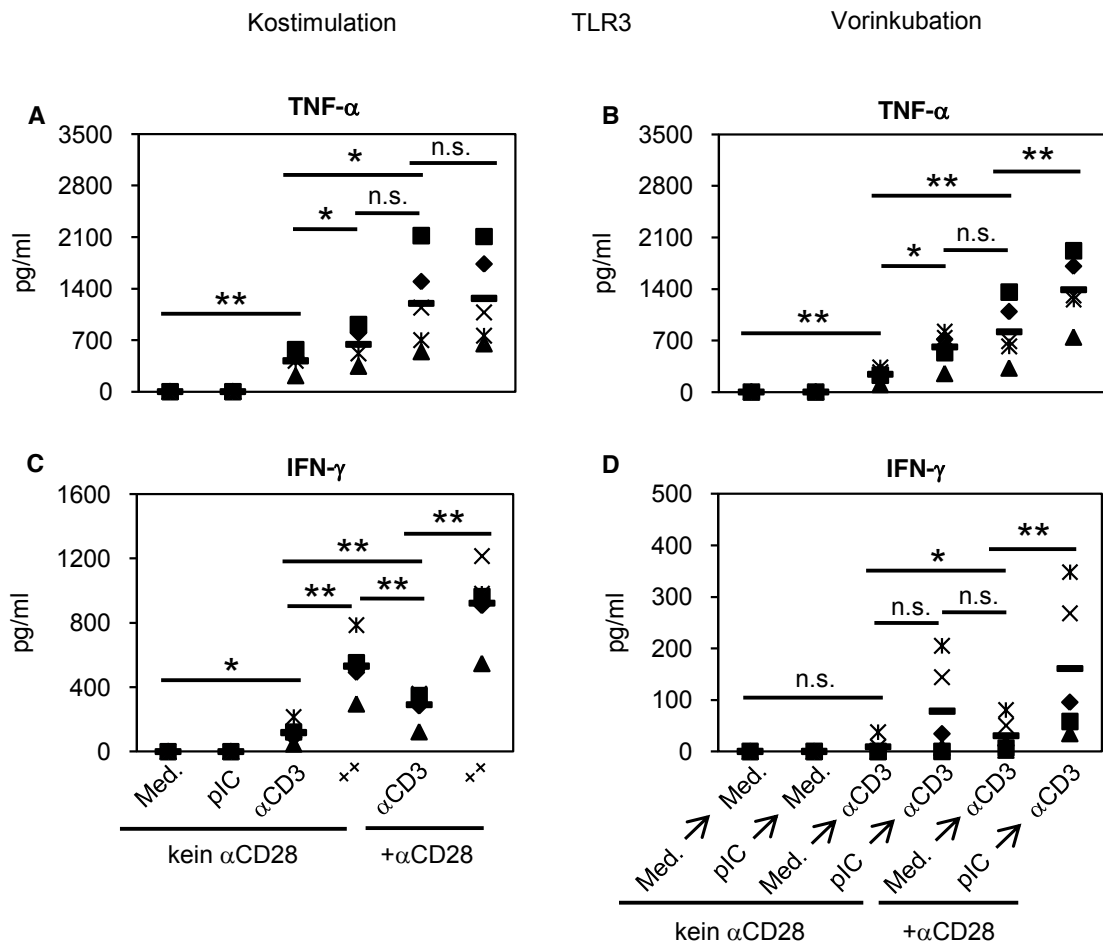
Das Phosphorylierungsprofil von p38 war nicht mit dem von Erk1/2 vergleichbar. CD4<sup>+</sup> Zellen bei denen keine Vorinkubation durchgeführt wurde, zeigten nach ein- und dreißigminütiger Stimulation unabhängig vom Stimulus eine umfassende p38 Phosphorylierung, die auch nach 250 Minuten nicht abgeklungen war (Abb. 5.27, links und Daten nicht gezeigt). Auch nach einminütiger Stimulation von vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde eine Stimulus unabhängige Phosphorylierung von p38 nachgewiesen. Nach 30 Minuten ließ sich jedoch eine deutlich verstärkte p38 Phosphorylierung von poly(I:C) vorinkubierten Zellen im Vergleich zu in Medium vorinkubierten Zellen nachweisen (Abb. 5.27, rechts). Nach Stimulation des TLR war eine leicht verstärkte p38 Phosphorylierung nachweisbar. Zusätzliche Kostimulation von CD28 steigerte die p38 Phosphorylierung (Abb. 5.27, rechts).

Nach einer Stimulationsdauer von 250 Minuten waren die Phosphorylierungsmuster identisch (Daten nicht gezeigt).

### **5.8 Auswirkungen der Präinkubation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C)**

Nach kurzer Stimulationsdauer (1-30 Minuten) waren zwischen CD4<sup>+</sup> T Zellen, die im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert oder bei 4°C gelagert wurden, deutliche, Stimulus unabhängige Unterschiede in der Phosphorylierung von Signalproteinen zu beobachten. Dies traf in besonderem Maße auf die Phosphorylierung von NF-κBp65 an Serin 529 (Abb. 5.25) sowie von p38 (Abb. 5.27) zu. Um die Bedeutung dieser Unterschiede für die Zytokininduktion zu bewerten wurde die Produktion von IFN-γ und TNF-α untersucht. IFN-γ und TNF-α wurden als Analyte ausgewählt, da in Vorexperimenten ihre Expression durch TLR3 Kostimulation unterschiedlich beeinflusst wurde. Während die IFN-γ Produktion durch Kostimulation mit poly(I:C) verstärkt wurde, schien die TNF-α Produktion dagegen von poly(I:C) nicht beeinflusst zu werden. Bei der vergleichenden Analyse der Überstände von vorinkubierten und direkt stimulierten Zellen durch ELISA wurden ähnliche, aber nicht identische Resultate erzielt. Poly(I:C) verstärkte die TNF-α Produktion nach TZR Stimulation, unabhängig davon ob CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) vorinkubiert wurden oder parallel zum TZR mit poly(I:C) stimuliert wurden (Abb. 5.28 A). In TZR/CD28 stimulierten T Zellen hatte die Kostimulation mit poly(I:C) nur einen schwachen Effekt. Bei drei von 5 Spendern resultierte TLR3 Kostimulation in einer leicht verstärkten TNF-α Produktion im Vergleich zur TZR/CD28 Stimulation. Bei zwei Spendern kam es zu einer, ebenfalls schwachen Abnahme. Wurden die CD4<sup>+</sup> T Zellen vorinkubiert ließ sich ein verändertes TNF-α Expressionsprofil beobachten. Poly(I:C) vorinkubierte, TZR/CD28 stimulierte CD4<sup>+</sup> T Zellen wiesen eine signifikant stärkere TNF-α Produktion auf als in Medium vorinkubierte Zellen (Abb. 5.28 B). Die IFN-γ Produktion unterschied sich nicht qualitativ, aber quantitativ zwischen direkt TLR3 kostimulierten und präinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen. Sowohl Kostimulation als auch Präinkubation mit poly(I:C) führte zu einer Verstärkung der TZR bzw. TZR/CD28 induzierten Expression (Abb. 5.28 C/D). Auffällig war jedoch, dass die IFN-γ Konzentration im Überstand von vorinkubierten Zellen deutlich geringer war, als in direkt stimulierten Zellen, ein Effekt der für TNF-α nicht so ausgeprägt zu beobachten war. Nach Lagerung der Zellen bei 4°C und anschließender TZR/CD28 Stimulation betrug die durchschnittliche IFN-γ Konzentration

291,6 pg/ml, nach 20 stündiger Vorinkubation in Medium bei 37°C lediglich 30,4 pg/ml (Abb. 5.28 C/D).



**Abb. 5.28: Effekte von poly(I:C) Kostimulation versus Präinkubation auf die TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Produktion.**  $10^6$  CD4 $^+$  T Zellen/ml wurden in Medium (Med.  $\rightarrow$ ) oder mit poly(I:C) (pIC  $\rightarrow$ ) vorinkubiert, und anschließend stimuliert (B, D) oder aber direkt nur mit poly(I:C) (pIC) bzw. parallel zum TLR Stimulus kostimuliert (++) (A, C). Proben wurden nach 24 stündiger Stimulation genommen und mit ELISA analysiert. Jedes Symbol repräsentiert die Daten eines Spenders, Durchschnittswerte sind als Balken dargestellt. Signifikanz ist als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) angezeigt.

CD4 $^+$  T Zellen, die über Nacht nicht bei 4°C, sondern bei 37°C gelagert wurden und anschließend wie bei den in Abb. 5.28 C dargestellten Ergebnissen mit poly(I:C) kostimuliert wurden, wiesen eine IFN- $\gamma$  Produktion auf, die mit der von poly(I:C) vorinkubierten CD4 $^+$  T Zellen vergleichbar war (Daten nicht gezeigt).

In den folgenden Experimenten wurde der Fokus auf vorinkubierte CD4 $^+$  T Zellen gelegt um eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch die Lagerungsbedingungen der Zellen zu

vermeiden. Zusätzlich wurde auch weiter mit CD4<sup>+</sup> T Zellen gearbeitet, die bei 4°C gelagert wurden, um zu ermitteln, welche zellulären Prozesse dadurch beeinflusst wurden.

#### 5.8.1 Modulation der Rezeptor Expression durch TLR3 Stimulation

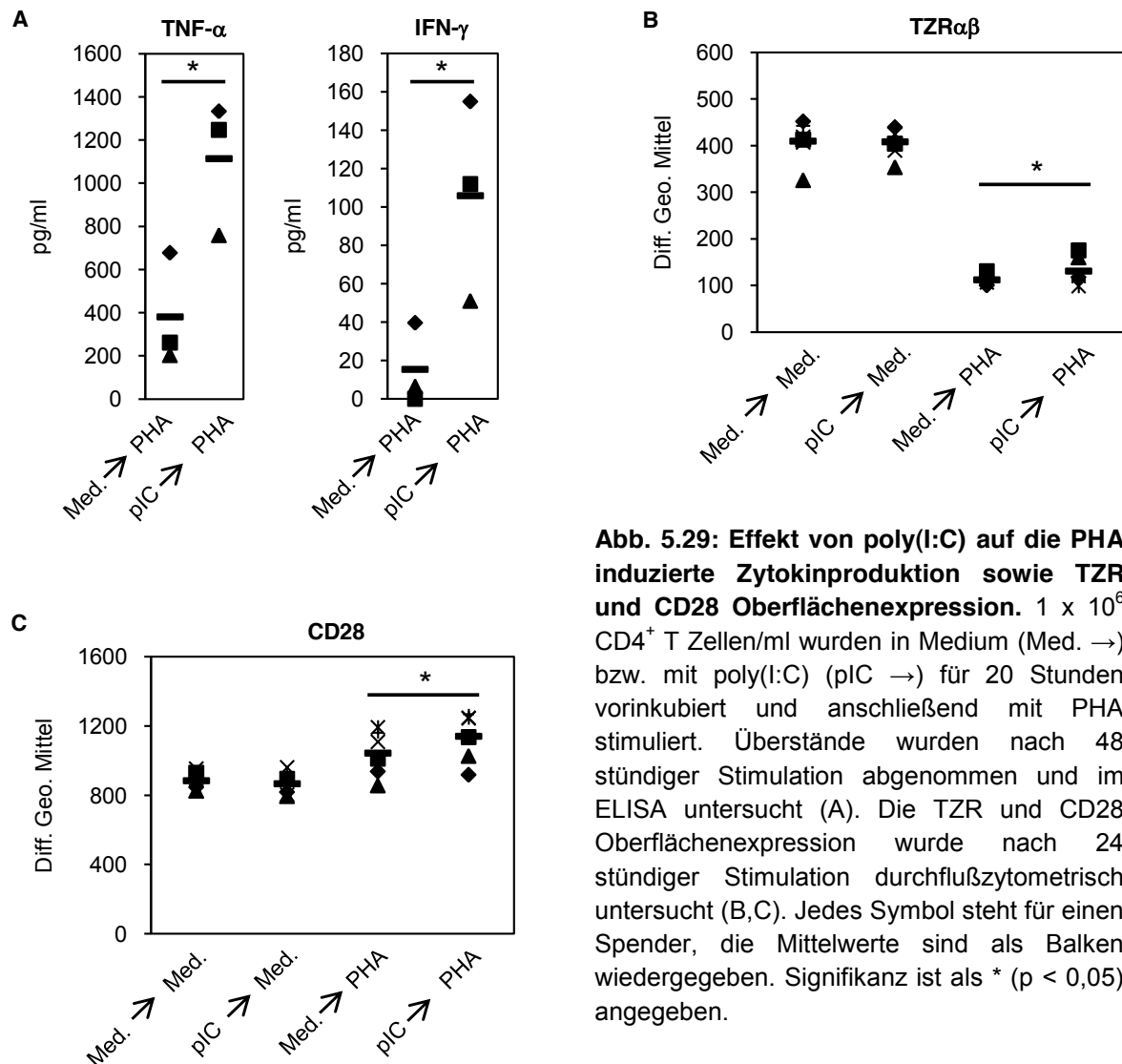
Auf der Suche nach einer möglichen Korrelation mit der verstärkten Aktivierung verschiedener Signalproteine nach poly(I:C) Vorinkubation, wurde untersucht, inwiefern die Expression des TLR oder des kostimulatorischen Moleküls CD28 moduliert wurde. Eine stärkere Expression der Rezeptoren würde unter Umständen mit einer stärkeren Aktivierung korrelieren.

Hierfür wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht wie in den oben geschilderten Experimenten mit agonistischen mAk gegen CD3 bzw. CD28 stimuliert, sondern mit PHA. Dies war notwendig, da die zur Stimulation eingesetzten Antikörper mit den später für die durchflusszytometrische Analyse benötigten Antikörpern interferierten. Initial wurde überprüft, ob die Stimulation mit PHA vergleichbare Auswirkungen auf die Expression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  hatte wie die Stimulation mit agonistischen mAk.

Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit PHA induzierte die Sekretion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Abb. 5.29 A). Wurden die CD4<sup>+</sup> T Zellen zuvor mit poly(I:C) inkubiert, waren sowohl die TNF- $\alpha$  als auch IFN- $\gamma$  Produktion im Vergleich zur Mediumkontrolle signifikant erhöht (Abb. 5.29 A). Die Ergebnisse waren mit den in Abb. 5.28 präsentierten Ergebnissen vergleichbar.

Die Oberflächenexpression des TLR wurde durch Vorinkubation mit poly(I:C) nicht beeinflusst (Abb. 5.29 B). Nach Stimulation der CD4<sup>+</sup> T Zellen mit PHA kam es erwartungsgemäß zur Internalisierung des TLR und damit verbunden zu reduzierter Oberflächenexpression. In CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) präinkubiert wurden, war nach PHA Stimulation geringfügig mehr TLR auf der Zelloberfläche nachweisbar als auf Zellen, die in Medium vorinkubiert wurden (Abb. 5.29 B). Auch die Oberflächenexpression von CD28 wurde durch die Vorinkubation mit poly(I:C) alleine nicht beeinflusst. Nach Stimulation mit PHA kam es zu einer verstärkten Expression von CD28 (Abb. 5.29 C) auf der Zelloberfläche von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) vorinkubiert wurden im Vergleich zu den Zellen, die in Medium vorinkubiert wurden.

Bei der vergleichenden Analyse von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert und anschließend stimuliert wurden, wurde eine vergleichbare Regulation der TLR Expression festgestellt, wie in den präinkubierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die CD28 Expression war überraschenderweise bei CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit PHA und poly(I:C) kostimuliert wurden, geringer als bei Zellen, die nur mit PHA stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt).

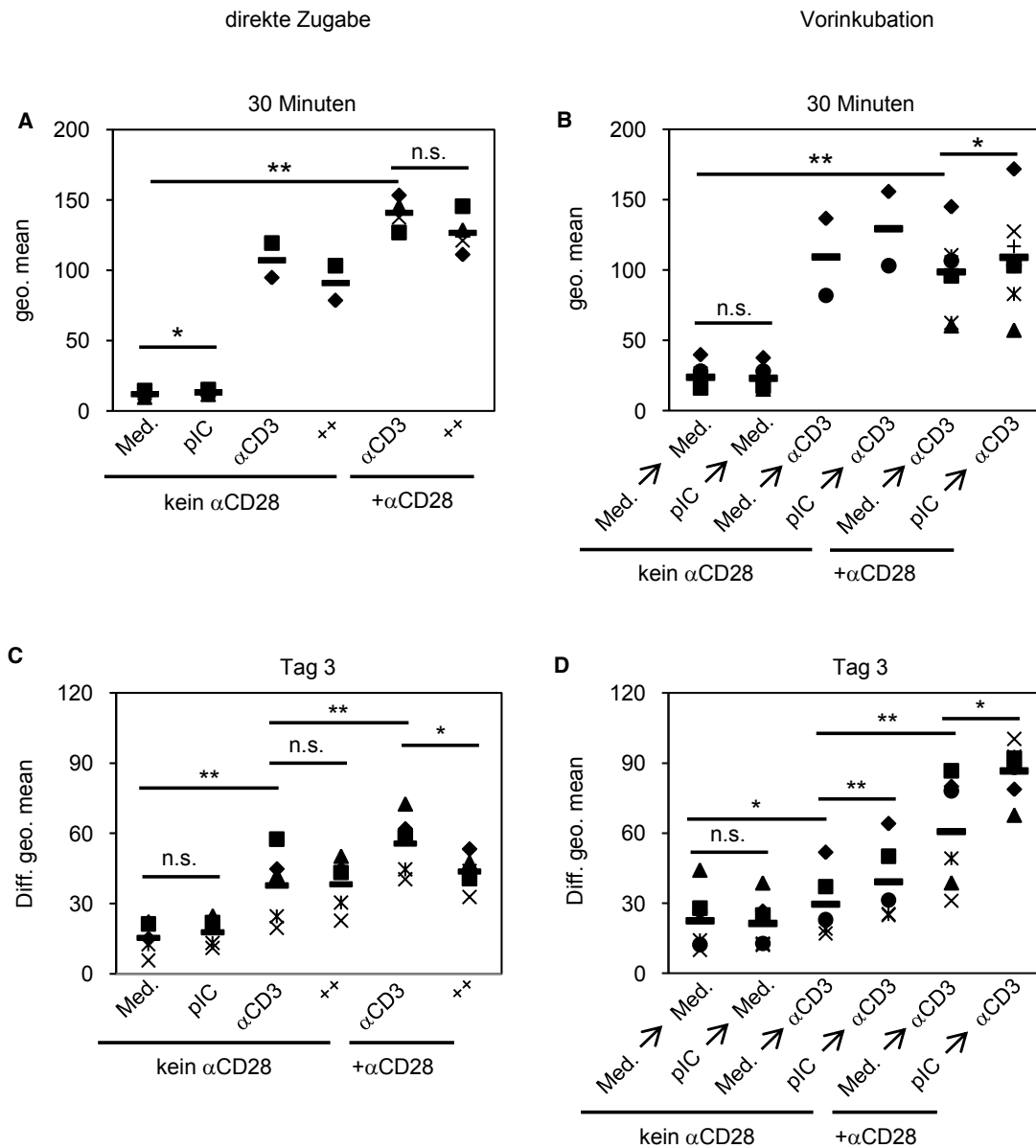


**Abb. 5.29: Effekt von poly(I:C) auf die PHA induzierte Zytokinproduktion sowie TZR und CD28 Oberflächenexpression.**  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen/ml wurden in Medium (Med.  $\rightarrow$ ) bzw. mit poly(I:C) (pIC  $\rightarrow$ ) für 20 Stunden vorinkubiert und anschließend mit PHA stimuliert. Überstände wurden nach 48 stündiger Stimulation abgenommen und im ELISA untersucht (A). Die TZR und CD28 Oberflächenexpression wurde nach 24 stündiger Stimulation durchflußzytometrisch untersucht (B,C). Jedes Symbol steht für einen Spender, die Mittelwerte sind als Balken wiedergegeben. Signifikanz ist als \* ( $p < 0,05$ ) angegeben.

### 5.8.2 Poly(I:C) beeinflusst die Phosphorylierung von Akt

Nach Ligation von CD28 kommt es zur Rekrutierung der PI3-Kinase und der nachfolgenden Aktivierung der Kinase Akt. Der Akt-Signalweg steht über den CBM Komplex mit dem NF- $\kappa$ B Signalweg in Verbindung. Darüber hinaus ist auch eine Rolle im IRF3 Signalweg beschrieben [47]. Ausgehend von dem Einfluss von poly(I:C) auf die Expression von CD28, wurde der Einfluss von poly(I:C) auf die Phosphorylierung von Akt mit der Phosflow™ Methode untersucht.





**Abb. 5.30: Einfluss von poly(I:C) auf die Akt Phosphorylierung.** Für die Untersuchung wurden  $CD4^+$  T Zellen, die vor dem Versuch bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurden, mit poly(I:C), anti-CD3 mAk oder einer Kombination beider Stimuli (++) behandelt, oder 20 Stunden in Medium (Med.→) oder mit  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) (pIC→) präinkubiert und anschließend über verschiedene Zeiträume mit  $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  OKT3 ( $\alpha$ CD3) oder Medium stimuliert. Sofern in der Abb. angegeben, wurde zusätzlich über CD28 kostimuliert. Pro Stimulation und Zeitpunkt wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen mit dem Akt mAk markiert und am Durchflusszytometer analysiert. A) Akt Phosphorylierung nach 30 minütiger Stimulation und direkter Zugaben von poly(I:C) B) Akt Phosphorylierung nach 30 Minuten bei vorinkubierten Zellen. Dargestellt bei A) und B) sind jeweils die geometrischen Mittel der Fluoreszenz der untersuchten Zellpopulationen. C) Akt Phosphorylierung nach 3 Tagen und direkter Zugabe von poly(I:C). D) Akt Phosphorylierung bei vorinkubierten Zellen nach 3 Tagen. Dargestellt bei C) und D) ist die Differenz der geometrischen Mittel der Fluoreszenz zwischen mAk markierten und unmarkierten Zellen. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, Mittelwerte sind als Balken dargestellt. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) angegeben.

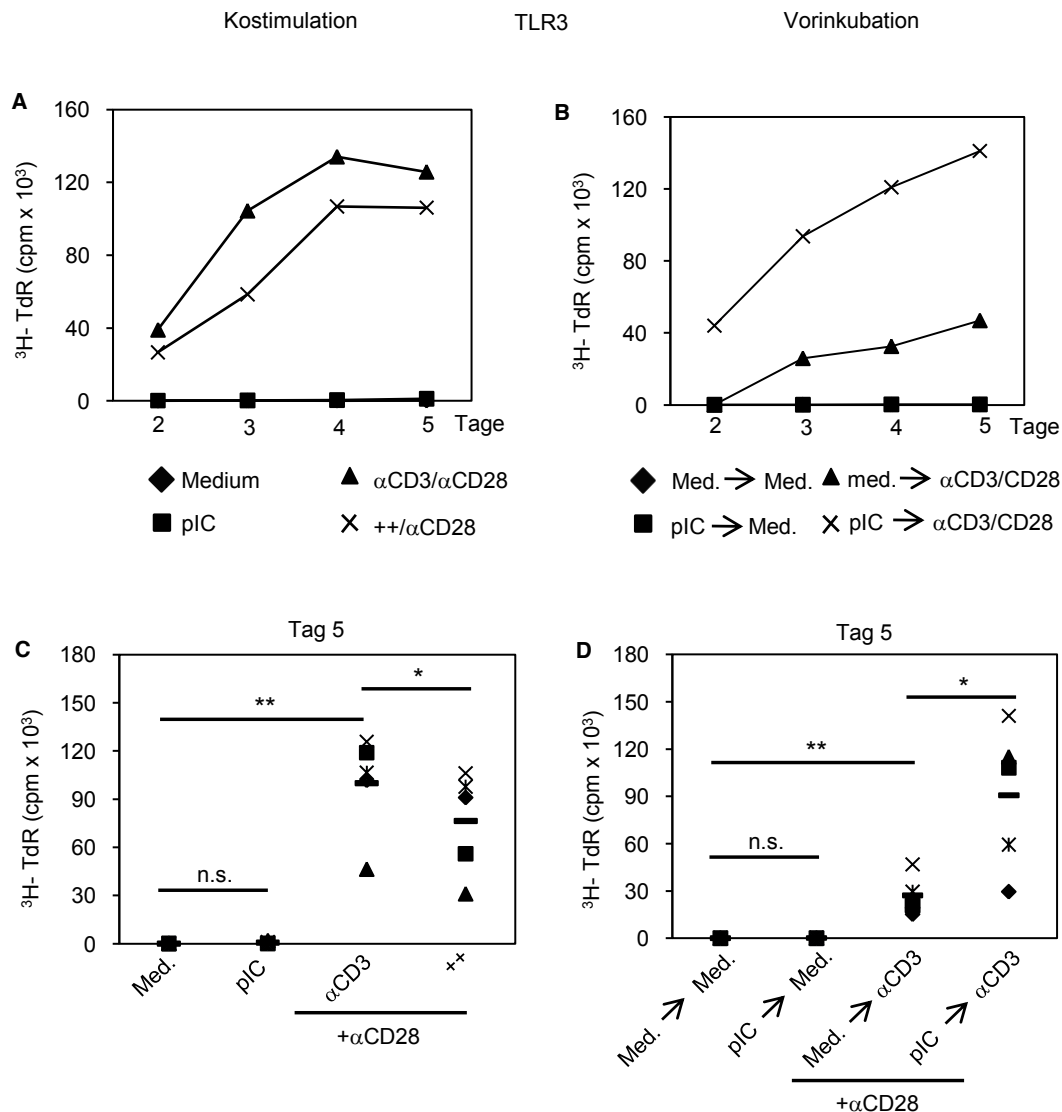
Im Vergleich zu NF- $\kappa$ Bp65 (Abb. 5.25 und 5.26) ist die basale Phosphorylierung von Akt gering. Wie für NF- $\kappa$ Bp65 hatte die Präinkubation mit poly(I:C) alleine keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt in CD4<sup>+</sup> T Zellen (Abb. 5.30 A-D). Nach Stimulation des TZR-Signalwegs durch CD3 Quervernetzung war gesteigerte Phosphorylierung von Akt an Serin 473 nachweisbar. Präinkubation mit poly(I:C) verstärkte die Akt Phosphorylierung nach TZR und TZR und TZR/CD28 Stimulation (Abb. 5.30 B). Eine 30 minütige Stimulation durch anti-CD3 mAk ohne zusätzliche CD28 Kostimulation wurde lediglich bei zwei Spendern durchgeführt, sodass sich hier keine Aussagen über die Signifikanz der Ergebnisse treffen ließ (Abb. 5.30 A, B). In TZR/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen war die Steigerung der Akt Phosphorylierung nach Präinkubation mit poly(I:C) signifikant (Abb. 5.30 B).

Nach Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen über drei Tage war die Reaktion von Zellen verschiedener Spender deutlich einheitlicher als nach einer Stimulationsdauer von 30 Minuten. Sowohl die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, durch CD3 als auch durch CD3/CD28 Quervernetzung induzierte eine signifikant verstärkte Phosphorylierung von Akt. Vorinkubation mit dem TLR3-Liganden steigerte die Akt Phosphorylierung nochmals (Abb. 5.30 D). Diese Ergebnisse korrelierten mit der beobachteten CD28 Expression.

CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert und anschließend für 30 Minuten durch anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert wurden, wiesen verglichen mit Zellen, die bei 37°C gelagert wurden, eine deutlich gesteigerte Akt Phosphorylierung auf (Abb. 5.30 A). Die Kostimulation mit poly(I:C) verstärkte unter diesen Bedingungen die Akt Phosphorylierung nicht (Abb. 5.30 B). Nach einer Stimulationsdauer von drei Tagen war die Akt Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) kostimuliert wurden im Vergleich zu Zellen, die nur mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert wurden, erniedrigt (Abb. 5.30 C).

### 5.8.3 Einfluss von TLR3 Kostimulation *versus* poly(I:C) Präinkubation auf die Proliferation

Werden CD4<sup>+</sup> T Zellen über den TZR und CD28 stimuliert induziert dies ihre Proliferation. Der Akt Signalweg hat Einfluss auf diesen Vorgang und vermittelt unter anderem pro-mitogene Signale. Der Einfluss von poly(I:C) auf den Akt Signalweg veranlasste uns die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen näher zu untersuchen. Dafür wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert und der Einfluss der TLR3 Kostimulation mit der Präinkubation mit poly(I:C) verglichen.



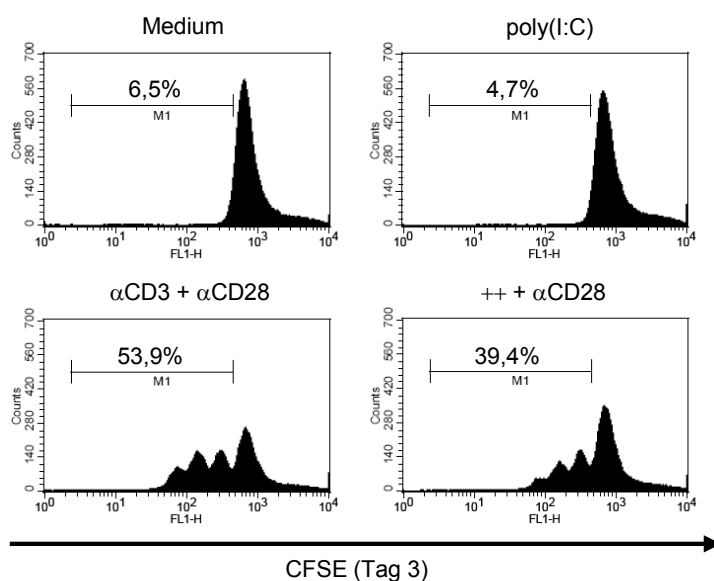
**Abb. 5.31: Proliferationsanalyse von  $\text{CD4}^+$  T Zellen.** Die Proliferation der Zellen wurde durch  $^3\text{H}$  Thymidin Inkorporation in die DNA quantifiziert. Für die Untersuchung wurden  $\text{CD4}^+$  T Zellen bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend mit poly(I:C), 2  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD3 mAk und einer Kombination der Stimuli (++) behandelt. Sofern in der Abb. angegeben, wurde zusätzlich mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-CD28 mAk kostimuliert (A, C). Alternativ wurden die Zellen 20 Stunden im Brutschrank in Medium (Med.→) oder mit 50  $\mu\text{g/ml}$  poly(I:C) (pIC→) präinkubiert und anschließend über CD3/CD28 ( $\alpha\text{CD3}$ ) stimuliert oder in Medium kultiviert. Dargestellt ist ein Zeitverlauf der  $^3\text{H}$  Thymidin Inkorporation für direkt stimulierte und vorinkubierte Zellen eines Spenders (A bzw. B), sowie ein Vergleich der Proliferation von  $\text{CD4}^+$  T Zellen von 5 verschiedenen Spendern nach 5 Tagen (C bzw. D). Jedes Symbol repräsentiert einen Spender, Mittelwerte sind als Balken dargestellt. Signifikanzen sind als \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ) angegeben.

Die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Thymidin als Maß der Proliferation wurde nach 2, 3, 4 und 5 Tagen, ermittelt. Der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die neu synthetisierte DNA war erstmals nach 2-3 tägiger Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk nachweisbar und erreichte ein Maximum nach 4-5 Tagen (Abb. 5.31 A, B). Auffällig waren bei dem Vergleich die großen Unterschiede in Bezug auf die  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation zwischen  $\text{CD4}^+$  T Zellen, die in

Medium im Brutschrank vorinkubiert und dann mittels CD3/CD28 Kreuzvernetzung stimuliert wurden und Zellen die nach der Isolation bei 4°C gelagert und anschließend direkt mit den agonistischen mAk aktiviert wurden. Der einzige Unterschied in der Behandlung der Zellen beruhte auf der Lagerung/Inkubation der Zellen, bevor sie stimuliert wurden, dennoch ist die Proliferation der im Brutschrank vorinkubierten Zellen deutlich geringer als die der bei 4°C vorinkubierten Zellen. Dieses Phänomen war ähnlich bei der Ausschüttung von IFN- $\gamma$  (Abb. 5.28, C und D) zu beobachten.

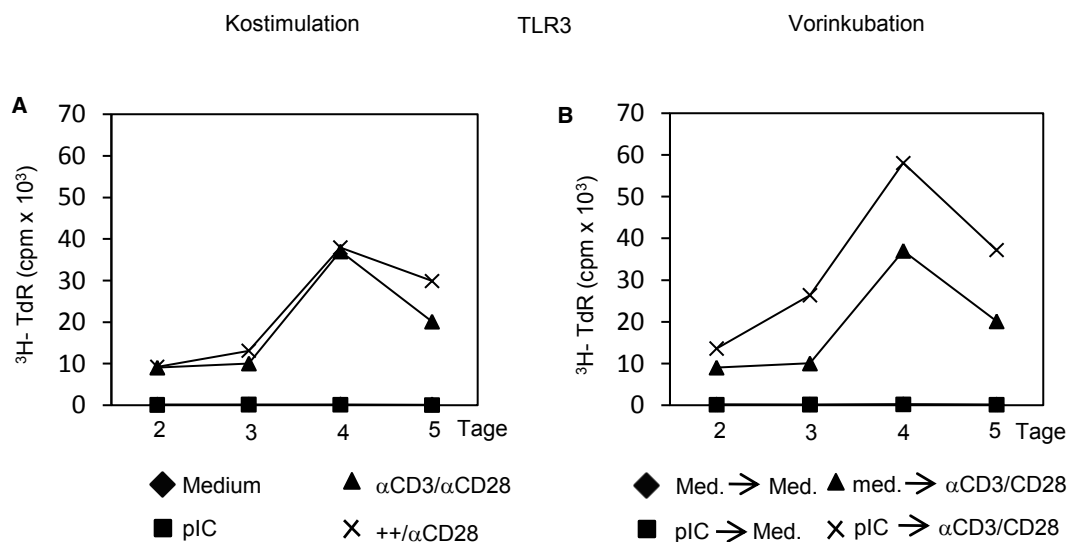
Darüber hinaus hatten die Vorinkubation mit poly(I:C) und TLR3 Kostimulation unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation von anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen. Die Kostimulation über TLR3 verringerte bei allen untersuchten Zeitpunkten die Proliferation (Abb. 5.31 A). Diese Ergebnisse konnten durch Versuche mit CFSE markierten Zellen untermauert werden (Abb. 5.32). CFSE ist ein Fluoreszenz Farbstoff, der mit der Zellmembran assoziiert und bei der Zellteilung an beide Tochterzellen weitergegeben wird. Proliferation geht also mit der relativen Abnahme der Fluoreszenz einher. Wie in Abb. 5.32 gezeigt, verringerte sich bei dem dargestellten Spender der Prozentsatz der CD4<sup>+</sup> T Zellen, die sich nach dreitägiger anti-CD3/CD28 Stimulation geteilt hatten durch Kostimulation mit poly(I:C) von knapp 54% auf 39%.

Poly(I:C) Vorinkubation dagegen verstärkte die Proliferation in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die durch CD3/CD28 Kreuzvernetzung stimuliert wurden (Abb. 5.31 B). Wie auch bei den TLR3 kostimulierten Zellen waren diese Auswirkungen bei der Analyse der <sup>3</sup>H Thymidin Inkorporation bei 5 Spendern nach 5 tägiger Stimulation signifikant (Abb. 5.31 D). TLR3 Stimulation ohne CD3/CD28 Kreuzvernetzung hatten unabhängig von der Applikation von poly(I:C) keinen Effekt auf die Zellproliferation.



**Abb. 5.32: Proliferationsanalyse von CD4<sup>+</sup> T Zellen nach CFSE Markierung.** CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden CFSE markiert und anschließend mit 50  $\mu$ g/ml poly(I:C), 2  $\mu$ g/ml OKT3 mAk und 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk oder kombiniert stimuliert. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 3 Tagen am Durchflusszytometer.

Poly(I:C) hatte einen verstärkenden Effekt auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, wenn diese mit dem TLR3-Ligand vorinkubiert wurden. Erfolgte dagegen die Stimulation mit poly(I:C) parallel zur Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk hatte es einen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation. Somit stellte sich die Frage ob die gegensätzlichen Effekte von poly(I:C) auf die Art der Applikation zurückzuführen waren, oder ob es sich dabei um ein Artefakt handelte, das durch die Lagerung der CD4<sup>+</sup> T Zellen bei 4°C hervorgerufen wurde. Um diese Frage zu beantworten wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen wie in den in Abb. 5.31 dargestellten Experimenten mit poly(I:C) stimuliert. Anders als in den in Abb. 5.31 präsentierten Versuchen wurden die CD4<sup>+</sup> T Zellen, die parallel zur Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk mit poly(I:C) kostimuliert wurden, nicht zuvor bei 4°C, sondern im Brutschrank gelagert.



**Abb. 5.33: Proliferationsanalyse von CD4<sup>+</sup> T Zellen.** Die Proliferation der Zellen wurde durch <sup>3</sup>H Thymidin Inkorporation in die DNA quantifiziert. Für die Untersuchung wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen im Brutschrank gelagert und anschließend mit poly(I:C), 2 µg/ml anti-CD3 mAk und einer Kombination der Stimuli (++) behandelt. Sofern in der Abb. angegeben, wurde zusätzlich mit 1 µg/ml anti-CD28 mAk kostimuliert (A, C). Alternativ wurden die Zellen 20 Stunden im Brutschrank mit 50 µg/ml poly(I:C) (pIC→) präinkubiert und anschließend über CD3/CD28 (αCD3/CD28) stimuliert oder in Medium kultiviert. Dargestellt ist ein Zeitverlauf der <sup>3</sup>H-Thymidin Inkorporation für direkt stimulierte und vorinkubierte Zellen eines repräsentativen Spenders.

Erwartungsgemäß war die <sup>3</sup>H-Thymidin Inkorporation in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die über den TLR3 Signalweg und CD28 stimuliert wurden in diesem Versuch vergleichbar (Abb. 5.33). Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert wurden, bewirkte die TLR3 Kostimulation in Zellen, die im Brutschrank gelagert wurden keine Reduktion der Proliferation, sondern hatte einen leicht verstärkenden Effekt (Abb. 5.33 A). Im Vergleich zu der Präinkubation mit

poly(I:C) war der Einfluss der TLR3 Kostimulation auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen jedoch moderat (Abb. 5.33 B).

Die Expansion von CD4<sup>+</sup> T Zellen ist abhängig von dem Wachstumsfaktor IL-2. Nach Aktivierung produzieren CD4<sup>+</sup> T Zellen IL-2 und induzieren auf autokrine Weise ihre Proliferation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch die Produktion von IL-2 untersucht. Für die IL-2 Expression war die Kreuzvernetzung von CD3 und CD28 Voraussetzung. Die Auswirkung von poly(I:C) auf die IL-2 Produktion durch CD4<sup>+</sup> T Zellen unterschieden sich zwischen Zellen verschiedener Spender. Eine eindeutige Korrelation zwischen IL-2 Produktion und Proliferation konnte jedoch nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

## 6 Diskussion

Toll-like Rezeptoren sind im Gegensatz zu T und B Zellrezeptor nicht variabel, somatische Rekombination findet nicht statt. Zuerst beschrieben wurde die Funktion von TLRs, speziell von TLR4, in Makrophagen. TLR wurden daher lange Zeit ausschließlich in Zusammenhang mit der angeborenen Immunität gesehen. Einen ersten Hinweis darauf, dass auch das adaptive Immunsystem durch TLR-Liganden beeinflusst wird, lieferte der Nachweis, dass TLR stimulierte APZ eine verstärkte kostimulatorische Kapazität aufweisen. Die Stimulation von dendritischen Zellen mit TLR3 und TLR4 Liganden steigert beispielsweise die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche [72], und damit die Fähigkeit  $CD4^+$  T Zellen zu aktivieren. Die Forschung der letzten Jahre machte zunehmend deutlich, dass auch T Zellen TLRs exprimieren können und maßgeblich durch diese beeinflusst werden (siehe 1.3.4). Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung von TLR3 für die Funktion humaner  $CD4^+$  T Zellen zu analysieren und die zu Grunde liegenden Signalwege näher zu charakterisieren.

### 6.1 TLR3 Expression in $CD4^+$ T Zellen

#### 6.1.1 Zelluläre Lokalisation von TLR3

Für TLRs, die Nukleinsäuren erkennen, ist eine intrazelluläre, endo-lysosomale Lokalisation beschrieben. Dies trifft auch für die Expression von TLR3 zu. Die für die meisten Zellpopulationen beschriebene intrazelluläre Expression von TLR3 wird durch die Linkerregion zwischen Transmembran- und TIR-Domäne reguliert [30]. Eine Expression auf der Zelloberfläche konnte nur bei Fibroblasten [73], Epithelzellen der Atemwege [26, 74] und  $\gamma\delta$  T Zellen [27] nachgewiesen werden, ein Regulationsmechanismus wurde in diesem Zusammenhang nicht beschrieben. In ruhenden  $CD4^+$  T Zellen wird TLR3 intrazellulär exprimiert (Abb. 5.4 und 5.6), eine genauere Lokalisation ließ sich auf Grund des geringen Zytoplasmagehalts der T Zellen in unseren Versuchen nicht eingrenzen (Daten nicht gezeigt). Die vorliegenden Beobachtungen decken sich mit Daten unserer Arbeitsgruppe, die eine intrazelluläre Lokalisation von TLR3 in  $\alpha\beta$  T Zellen zeigen [27]. In Jurkat Zellen konnte eine schwache Oberflächenexpression von TLR3 in unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Expression auf der Zelloberfläche war jedoch verglichen mit der intrazellulären TLR3 Expression äußerst gering (Abb. 5.4). Ferner konnte für frisch isolierte

CD4<sup>+</sup> T Zellen gezeigt werden, dass eine Stimulation des TZR Signalwegs zu einer Hochregulation von TLR3 innerhalb der Zelle und auf der Zelloberfläche führte. Die TLR3 Oberflächenexpression war jedoch vergleichsweise schwach (Abb. 5.6). Eine verstärkte TLR3 Expression durch CD4<sup>+</sup> T Zellen nach CD3 und CD28 Kreuzvernetzung wurde bereits von Holm und Kollegen beschrieben. Über die zelluläre Lokalisation von TLR3 trafen Holm und Kollegen jedoch keine Aussage [60]. Eine funktionelle Relevanz von TLR3 auf der Zelloberfläche wurde für Epithelzellen beschrieben [26, 74]. So konnten Hewson und Kollegen zeigen, dass die Blockade von TLR3 auf der Zelloberfläche durch antagonistische Antikörper die poly(I:C) induzierte Produktion von IL-6, IL-8 und RANTES signifikant verringerte [74]. Eine funktionelle Rolle von TLR3 auf der Zelloberfläche von CD4<sup>+</sup> T Zellen erscheint dagegen unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass poly(I:C) induzierte Genexpression durch ConcanamycinA, einen Inhibitor der V-Typ ATPase, vollständig reprimiert werden konnte (Abb. 5.5). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Inhibitor Chloroquin erhalten [60]. Fukuda et al. wiesen die pH Abhängigkeit der TLR3-poly(I:C) Interaktion nach. Danach ist die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand bei pH 4,2 am höchsten, bei neutralem pH dagegen äußerst gering [34]. Würde poly(I:C) in CD4<sup>+</sup> T Zellen durch TLR3 auf der Zelloberfläche oder den zytoplasmatischen Rezeptor MDA-5 erkannt, dann wäre zu erwarten, dass die Inhibition der lysosomalen Azidifizierung keinen, oder einen eher geringen Einfluss auf die Transkription von *Irf7* hat. Es erscheint somit durchaus wahrscheinlich, dass der schwachen TLR3 Oberflächen Expression keine funktionelle Relevanz zukommt.

Möglicherweise beruhte die Oberflächenexpression lediglich auf verstärkter Gesamtexpression von TLR3 in Kombination mit gesteigertem Vesikeltransport. Nach Stimulation des TZR Signalwegs kam es nicht nur zu gesteigerter TLR3 Expression, sondern, wie zu erwarten, auch zur Internalisierung des TZR (Abb. 5.29). Im Rahmen des Membranrecycling nach der TZR Internalisierung könnte dann fehlsortierter, verstärkt intrazellulär exprimierter TLR3 an die Zelloberfläche gelangen. Für diese Hypothese spricht, dass auch poly(I:C) Stimulation zu einer verstärkten, wenn auch nicht signifikanten Steigerung der TLR3 Proteinexpression führte, die sich nicht in einer verstärkten TLR3 Oberflächenexpression niederschlug (Abb. 5.6). TLR3 Expression löste keine TZR Internalisierung aus, sodass kein Membranrecycling stattfand, durch das TLR3 an die Zelloberfläche kommen konnte.



### 6.1.2 Die Expression von TLR3

Das Muster der *Tlr3* Transkription unterschied sich deutlich von dem der Proteinexpression (Abb. 5.7). Der TLR3 mRNA Gehalt war nach Stimulation mit poly(I:C) deutlich erhöht. Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk hatte dagegen keinen verstärkenden Effekt auf die *Tlr3* Transkription im Vergleich zur Mediumkontrolle. Kostimulation der TZR/CD28 Signalwege über TLR3 hatte nur einen vergleichsweise schwach verstärkenden Effekt auf die *Tlr3* Transkription im Vergleich zur Mediumkontrolle. Im Vergleich zur Stimulation mit poly(I:C) alleine, war überraschenderweise nach poly(I:C) Kostimulation der TZR/CD28 Signalwege eine deutlich geringerer *Tlr3* Transkriptmenge nachweisbar (Abb. 5.7).

Die Transkription von *Tlr3* kann durch IFN- $\beta$  aktiviert werden [75]. Vor kurzem berichteten Agarwal und Kollegen von einer aktivierenden Rolle von IFN- $\alpha$ 2 [76]. Die regulatorischen Elemente des *Tlr3*-Promotors umfassen ein TATA ähnliches Element sowie ISRE/IRF und STAT Elemente [75]. Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) aktivierte den Transkriptionsfaktor IRF3 (Abb. 5.16), der an regulatorische ISRE/IRF Elemente binden kann. Poly(I:C) Stimulation induzierte ferner die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (Abb. 5.15), die regulatorische STAT Elemente erkennen. Die Aktivierung von IRF3 und STAT-Proteinen erklärt die Induktion der *Tlr3* Transkription nach poly(I:C) Stimulation.

Die vergleichsweise geringere *Tlr3* Transkription nach kombinierter Stimulation mit anti-CD3 mAk und poly(I:C) ist möglicherweise auf die massiv verstärkte Transkription in TZR aktivierten CD4<sup>+</sup> T Zellen zurückzuführen. Nach CD3 Kreuzvernetzung wurde, wie zu erwarten, eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen produziert (Abb. 5.11 und 5.28). Ferner wurde beobachtet, dass der RNA Gehalt von anti-CD3 mAk stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen deutlich über dem von unstimulierten oder TLR3 stimulierten Zellen lag (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptionsmaschinerie mag in anti-CD3 mAk/TLR3 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen z.B. mit der Transkription von Zytokin- und Chemokingenen soweit ausgelastet gewesen sein, dass es zu vergleichsweise geringerer *Tlr3* Transkription kam. Auch eine inhibierende Regulation der *Tlr3* Transkription kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, erscheint aber nach dem Wissen, dass wir über die regulatorischen Elemente des proximalen *Tlr3* Promotor haben als eher unwahrscheinlich [75].

Damit bleibt die Diskrepanz zwischen RNA und Protein Expression von TLR3 zu klären. Warum resultierte die deutlich verstärkte Transkription nach poly(I:C) Stimulation nur in einer leicht verstärkten Proteinexpression? Und warum war auf der anderen Seite nach Stimulation mit anti-CD3 mAk keine Erhöhung der Transkriptionsrate, wohl aber der

Proteinexpression zu verzeichnen? Naheliegende Ursachen hierfür wären entweder eine verstärkte Proteindegradierung nach TLR3 Stimulation oder aber eine gesteigerte Translation der TLR3 mRNA nach Stimulation des TZR Signalwegs. Über TLR3 induzierte Proteindegradierung gibt es weder Berichte in der Literatur, noch ließen sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit dafür Anhaltspunkte finden. Eine Ausnahme stellte die Degradierung von  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  dar (Abb. 5.24), für die jedoch zusätzlich zur Stimulation von TLR3 ein TZR Stimulus Voraussetzung war.

Ein Mechanismus, der eine verstärkte Translation von TLR3 mRNA regulieren könnte, stellten Kaur und Kollegen vor [77]. Sie berichteten, dass die Aktivierung von mTOR über den Akt Signalweg zu einer IFN abhängigen, verstärkten Translation von ISGs führt. Über mTOR wird ein Repressor des eukariotischen Translations Initiations Faktors eIF4E deaktiviert und die Formation des eIF4E/eIF4G Komplex (für die Translationsinitiation benötigt) gefördert. Nach Stimulation des TZR Signalwegs konnte sowohl eine verstärkte Expression von  $\text{IFN-}\gamma$  (Abb. 5.28) als auch eine gesteigerte Aktivierung des Akt (Abb. 5.30) Signalwegs gezeigt werden. Zusammen könnten diese beiden Faktoren zu einer verstärkten Translation des ISG *Tlr3* geführt haben.

## 6.2 Expression des Aktivierungsmarkers CD69

Initial wurde der Effekt der Stimulation von TLR3 auf  $\text{CD4}^+$  T Zellen durch Analyse der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass poly(I:C) Stimulation alleine nur einen geringen Einfluss auf die Expression von CD69 hatte, während TLR3 Kostimulation von  $\text{CD4}^+$  T Zellen, die durch CD3 und CD28 Kreuzvernetzung stimuliert wurden, zu einer signifikanten Verstärkung der CD69 Expression führte (Abb. 5.8). Dieses Ergebnis widerspricht Daten, die von Simone et al. veröffentlicht wurden. Diese zeigen eine deutliche Expression von CD69 nach alleiniger Stimulation von TLR3 [78]. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass Simone et al. mit positiv isolierten  $\text{CD4}^+$  T Zellen gearbeitet haben, während im Rahmen der vorliegenden Arbeit negativ selektionierte  $\text{CD4}^+$  T Zellen untersucht wurden. Während bei der Negativselektion alle „Nicht- $\text{CD4}^+$  T Zell“-Populationen, wie im Methodenteil beschrieben, mit Antikörpern markiert und verworfen werden, werden bei der Positivselektion  $\text{CD4}^+$  T Zellen mittels eines CD4 mAk markiert und so isoliert. Dabei kommt es zur Quervernetzung von CD4 Molekülen, was zu einer moderaten Aktivierung der Zellen führen kann. Die bei Simone et al. durchgeführte TLR3 Stimulation erfolgte also mit moderat voraktivierten  $\text{CD4}^+$  T Zellen. Entsprechend

wurde mit positiv selektionierten CD4<sup>+</sup> T Zellen eine Herunterregulation der CD28 Expression nach TLR3 Stimulation beobachtet, die sich mit negativselektionierten Zellen nur nach PHA Stimulation zeigen ließ (Abb. 5.29). Um Untersuchungen an nicht aktivierten CD4<sup>+</sup> T Zellen durchführen zu können ist es erforderlich, diese durch Negativseparation zu isolieren.

### 6.3 Zytokin und Chemokin Expression nach TLR3 Stimulation

Die Expression von IFN- $\gamma$  wurde nach Stimulation des TLR Signalwegs induziert, wogegen Stimulation von TLR3 allein keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Expression hatte (Abb. 5.2 und 5.28). Wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen jedoch parallel über den TLR und über TLR3 stimuliert, zeigte sich ein synergistischer Effekt der beiden Stimuli, dessen Ausmaß abhängig von der eingesetzten Konzentration des TLR3 Liganden poly(I:C) war (Abb. 5.2). Dieser synergistische Effekt ließ sich nicht nur nach Kostimulation mit poly(I:C), sondern auch mit Liganden von TLR8 beobachten (Daten nicht gezeigt). Poly(I:C), das mit dem Transfektionsreagenz LyoVec komplexiert war, wirkte toxisch auf CD4<sup>+</sup> T Zellen, während ebenfalls mit LyoVec komplexierte ssRNA40 und ssRNApolyU, zwei TLR8 Liganden, einen kostimulatorischen Effekt auf die TLR induzierte IFN- $\gamma$  Sekretion aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Somit wiesen weder LyoVec noch poly(I:C) *per se* eine toxische Wirkung auf, in Kombination war dies jedoch der Fall. Der Grund hierfür könnte sein, dass poly(I:C) in komplexierter Form auch in das Zytoplasma gelangt, wo extrazellulär appliziertes poly(I:C) wahrscheinlich nicht zu finden ist. Wie genau dsRNA bzw. poly(I:C) von CD4<sup>+</sup> T Zellen aufgenommen wird und mit TLR3 in Kontakt kommt ist zwar noch ungeklärt, es konnte aber gezeigt werden, dass die Induktion von IFN- $\beta$  durch poly(I:C) Stimulation in TLR3 transfizierten HEK293 Clathrin vermittelte Endozytose voraussetzt [39], während die IFN- $\alpha$  Produktion durch virusinfizierte dendritische Zellen auf Autophagie angewiesen ist [40]. In beiden Fällen wurde somit der TLR3 Ligand in Vesikeln transportiert und kam nicht mit dem Zytosol in Kontakt. Im Zytoplasma kann poly(I:C) auch an den zytosolischen dsRNA Rezeptor MDA-5 binden, worauf MDA-5 Stimulation Apoptose vermitteln kann [79, 80], was den „toxischen“ Effekt von poly(I:C) LyoVec erklären könnte. Beteiligt an der Induktion von Apoptose ist das Adaptormolekül IPS-1 [80], das in den TLR3 Signalweg nicht involviert ist.

Neben IFN- $\gamma$  wurden auch die Expression der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-4 und der Chemokine IP-10, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES, und IL-8 sowie von Granzym B untersucht. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IP-10, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES und Granzym B wurden zur eingehenderen Analyse ausgewählt, da sie bei der Bekämpfung viraler Infektionen eine

wesentliche Rolle spielen (siehe 1.3.3) [55]. IL-2 ist das wesentliche Zytokin für die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen. IL-4 und auch IFN- $\gamma$  spielen bei der Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen eine maßgebliche Rolle (siehe 1.1.2).

Die Produktion aller untersuchten Proteine wurde durch alleinige TLR3 Stimulation nicht beeinflusst. Für die Induktion der Expression war in allen Fällen die Aktivierung des TLR Signalwegs nötig (Abb. 5.9, 5.11, 5.12. und 5.28). Kostimulation mit poly(I:C) verstärkte die TLR induzierte Produktion von allen untersuchten Proteinen mit der Ausnahme von IL-4 und IL-8. Die kostimulatorische Wirkung von TLR3 wurde mit der von CD28, des „klassischen“ CD4<sup>+</sup> T Zell Korezeptors, verglichen. Erwartungsgemäß steigerte auch die TLR Kostimulation mit anti-CD28 mAk die Produktion der oben aufgeführten Proteine mit Ausnahme von Granzym B. Für RANTES und IL-8 führte CD28 Kostimulation nicht zu einer signifikanten Steigerung der Produktion. Die Produktion von IP-10, RANTES, IFN- $\gamma$  und Granzym B wurde durch Kostimulation mit poly(I:C) signifikant gesteigert und dies in einem stärkeren Ausmaß als durch CD28 Kostimulation. In Bezug auf die Produktion von IP-10, RANTES, IFN- $\gamma$  und Granzym B erwies sich die TLR3 Kostimulation also als potenter als die CD28 Kostimulation. Unter physiologischen Bedingungen könnte dies bedeuten, dass CD4<sup>+</sup> T Zellen, die über den TLR ihr Antigen und über TLR3 eine virale Infektion erkannt haben, nicht auf Kostimulation durch APZ angewiesen sind, um antivirale Zytokine und Chemokine zu produzieren. Die kombinierte Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 mAk, anti-CD28 mAk und poly(I:C) führte bei allen untersuchten Proteinen, mit Ausnahme von IL-8 und Granzym B, zu der stärksten Produktion.

Eine kostimulatorische Wirkung auf die Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde bereits für TLR2, TLR5 und TLR7/8 beschrieben [81]. Peng et al berichtet, dass TLR8 Stimulation die regulatorischen Fähigkeiten von Treg zum Teil aufhebt, sodass die kostimulatorische Wirkung von TLR8 möglicherweise auf eine verminderte Suppression der CD4<sup>+</sup> T Zellen durch Treg zurückzuführen ist [82]. Auch die Vorinkubation von Treg mit TLR2 Liganden verringert deren suppressive Eigenschaften [9]. Stimulation mit dem TLR5 Liganden Flagellin verstärkt dagegen die suppressive Kapazität von Treg [83]. Treg exprimieren auch CD4 auf der Oberfläche und unterscheiden sich von den restlichen CD4<sup>+</sup> T Zellen durch eine sehr starke CD25 Expression. Treg waren bei der Negativselektion von CD4<sup>+</sup> T Zellen Bestandteil der isolierten CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation, die im Rahmen der hier präsentierten Versuche zum Einsatz kam. Es bestand die Möglichkeit, dass TLR3 Kostimulation die suppressive Kapazität der Treg beeinflusste und somit die verstärkte Zytokin und Chemokin Produktion hervorgerufen wurde. Diese Möglichkeit wurde untersucht indem in einem weiteren

Isolationsschritt CD25 exprimierende Treg aus der CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation entfernt wurden. Die Auswirkung der poly(I:C) Kostimulation auf die gesamte CD4<sup>+</sup> und die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellpopulation wurde verglichen. Es konnten keine Unterschiede der IFN- $\gamma$  Produktion zwischen den beiden CD4<sup>+</sup> T Zellpopulationen festgestellt werden (Abb. 5.14). Die deutlichen Unterschiede in der Menge des IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand zwischen dem in Abb. 5.2 dargestellten Versuch und den in Abb. 5.14 gezeigten Ergebnissen lassen sich vermutlich auf leicht abweichende Versuchsbedingungen zurückführen. Für das Experiment, das in Abb. 5.2 dargestellt ist, wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten stimuliert, während sonst Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten zum Einsatz kamen. Auch die vergleichende Analyse der Produktion von IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES bei CD4<sup>+</sup> T Zelle eines Spenders lieferte keine Hinweise darauf, dass die verstärkte Zytokin und Chemokin Produktion nach TLR3 Kostimulation auf eine verringerte inhibitorische Wirkung der Treg zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

Von besonderem Interesse waren die Auswirkungen, die die TLR3 Kostimulation auf die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-4 hatte. Diesen beiden Zytokinen kommt eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen in Th1 und Th2 Zellen zu. Die IFN- $\gamma$  Produktion wurde durch poly(I:C) massiv gesteigert, auf die Expression von IL-4 hatte der TLR3 Ligand dagegen nur sehr schwache Auswirkungen (Abb. 5.12). Das Expressionsprofil der beiden Zytokine deutete daraufhin, dass TLR3 Kostimulation die Differenzierung in Th1 Zellen, die durch IFN- $\gamma$  ausgelöst wird, fördert. IL-4 dagegen wird für die Bildung von Th2 Zellen benötigt. Diese Auswirkung der TLR3 Kostimulation erschien durchaus naheliegend, da Th1 Zellen für die zelluläre Immunantwort und damit in erster Linie für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene zuständig sind. Th2 Zellen unterstützen dagegen die Antikörperproduktion indem sie die Differenzierung von B Zellen zu Plasmazellen unterstützen. Th2 Zellen sind somit Teil der humoralen Immunantwort. Der überwiegende Anteil des Reproduktionszyklus aller Viren findet innerhalb der Wirtszellen statt. Zur Bekämpfung einer Virusinfektion würden also in erster Linie Th1 Zellen benötigt [84]. Die Differenzierung in Th1- *versus* Th2-Zellen erfolgt durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, T-bet im Fall der Th1-, GATA-3 im Fall der Th2 Differenzierung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren durch qRT-PCR untersucht. Sie erwies sich jedoch als hochgradig variabel zwischen verschiedenen Spendern. Reproduzierbare Auswirkungen nach TLR3 Kostimulation konnten nicht festgestellt werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Holm und Kollegen, die keine signifikanten Unterschiede nach poly(I:C) Kostimulation zwischen der Expression von T-bet, GATA-3 und des TH17 Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t feststellen konnten [60]. Die stark

ausgeprägte Spendervariabilität mag mit Vorerkrankungen und mit Differenzierung eines Teils der CD4<sup>+</sup> T Zellen im peripheren Blut in Zusammenhang stehen.

Die Th1 Differenzierung geht außer mit der Expression von IFN- $\gamma$  und T-bet auch mit der Expression von TIM-3 einher [85]. Die TIM-3 Expression wurde zwar durch TLR3 Stimulation allein nicht beeinflusst, aber die Kostimulation des TLR3 Signalwegs mit poly(I:C) steigerte den Prozentsatz TIM-3 exprimierender Zellen deutlich. Ein Ligand von TIM-3 ist Galektin-9. Galektin-9 wird u.a. auf Makrophagen exprimiert, die mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert sind. Ligation von TIM-3 und Galektin-9 vermittelt sowohl antimikrobielle Aktivität der Makrophagen [85], als auch eine Inhibition der Th1 Reaktion [86]. Die Ligation von Galektin-9 an TIM-3 induziert Apoptose in den TIM-3 exprimierenden Zellen und führt zu einem selektiven Verlust von Th1 Zellen [86], was sich in einer verringerten IFN- $\gamma$  Produktion niederschlägt. In dem Zeitraum, in dem im Rahmen dieser Arbeit die IFN- $\gamma$  Produktion analysiert wurde (1-3 Tage), konnte nur eine geringfügige Modulation der TIM-3 Expression zwischen verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Ein Einfluss der TIM-3 Expression auf die untersuchte IFN- $\gamma$  Produktion erscheint daher unwahrscheinlich.

Anhand der Zytokinexpression und TIM-3 Expression lässt sich schließen, dass TLR3 Kostimulation einen begünstigenden Einfluss auf die Th1 Differenzierung hatte.

Um die molekularen Ursachen für den Einfluss von poly(I:C) auf die Zytokin und Chemokin Produktion zu ermitteln, wurden die TLR3 nachgeschalteten Signalwege untersucht.

## 6.4 Der IRF3 Signalweg

Die Auswirkung der Stimulation von TLR3 auf den IRF3 Signalweg wurden durch Westernblotanalysen und qRT-PCR Experimente untersucht. Als Maß für die Aktivität von IRF3 wurde die Transkriptionsrate von *Irf7* gewählt. IRF3 und IRF7 sind essentiell für die Induktion der Typ I IFN Expression nach Virusinfektion. IFN- $\beta$  und IFN- $\alpha$ 1 werden durch IRF3 reguliert, IRF7 reguliert die Expression weiterer IFN- $\alpha$  Subtypen [87]. IRF3 wird in Säugerzellen konstitutiv exprimiert, konstitutive IRF7 Expression erfolgt dagegen nur in B Zellen und dendritischen Zellen. In allen weiteren untersuchten humanen Zellpopulationen wird die IRF7 Expression induziert. Als Auslöser sind TLR3 und TLR4 Aktivierung, aber auch die Stimulation mit IFN- $\beta$  beschrieben [71]. IRF7 hat eine Halbwertszeit von ca. 30 Minuten, wodurch eine zeitlich begrenzte IFN Expression sichergestellt wird [87].

Die regulatorischen Sequenzen des *Irf7* Gens umfassen IFN *stimulated response elements* (ISRE), IRF bindende Elemente (IRFE) und eine NF- $\kappa$ B Bindestelle [88, 89]. ISRE regulierte Gene werden üblicherweise über den Jak-STAT Signalweg aktiviert. Nach IFN Stimulation werden STAT-1 und -2 aktiviert, die zusammen mit IRF9 einen Komplex bilden und an ISRE Sequenzen binden [90]. Unabhängig von IFN kann die *Irf7* Transkription durch Rekrutierung des Virus aktivierten Faktor (VAF)-Komplexes an ISRE und /oder IRFE Sequenzen eingeleitet werden [89]. VAF besteht aus einem IRF3/IRF7 Heterodimer assoziiert mit den Koaktivatoren p300 und dem CREB bindenden Protein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stimulation von TLR3 die Transkription von *Irf7* auch in primären CD4<sup>+</sup> T Zellen aktiviert (siehe Abschnitt 5.5, Abb. 5.16). Als Ursache kam entweder die direkte Induktion der Transkription durch Aktivierung von IRF3 und des VAF in Betracht oder die Expression von IFN- $\beta$  und die Aktivierung des Jak-STAT Signalwegs. Wenn die Expression von IRF7 durch IFN- $\beta$  induziert worden wäre, wäre IRF3 indirekt durch Regulation der IFN- $\beta$  Expression auch an der Aktivierung der *Irf7* Transkription beteiligt. CD4<sup>+</sup> T Zellen gelten jedoch im Gegensatz zu dendritischen Zellen und verschiedenen anderen Zellpopulationen nicht als Typ I IFN Produzenten und auch in dieser Arbeit konnte kein IFN- $\beta$  im Überstand von poly(I:C) stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen nachgewiesen werden. Unterschiede im Expressionsprofil von Zytokinen zwischen verschiedenen Zellpopulationen sind nicht ungewöhnlich. Lundberg und Kollegen beschreiben z.B. große Unterschiede in der Zytokinexpression sowie der zu Grunde liegenden Signaltransduktionswegen zwischen myeloiden und nicht myeloiden humanen Zellen nach TLR3 Stimulation [91].

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob CD4<sup>+</sup> T Zellen nach poly(I:C) Stimulation eventuell geringe Mengen Typ I IFN produzieren, wurde die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 untersucht.

STAT1 ist sowohl an der Signalweiterleitung nach Typ I als auch Typ II IFN Erkennung beteiligt [92, 93]. Über die Rolle von STAT3 in der Typ I IFN Signaltransduktion gibt es widersprüchliche Informationen. Nach Plataniias und Kollegen ist STAT3 an der Typ I IFN Signaltransduktion beteiligt [92], Kaur und Kollegen dagegen berichten, dass STAT3 in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt. [93]. Neben einer möglichen Beteiligung an der IFN induzierten Signaltransduktion wird STAT3 durch andere Zytokine wie z.B. IL-6 aktiviert [94]. In dem in Abschnitt 5.5 dargestellten Experiment war die Regulation der Phosphorylierung der beiden Moleküle vergleichbar (Abb. 5.15). Die Inkubation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, mit dem Überstand von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) stimuliert wurden, induzierte die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 nach 150 Minuten. Der Überstand von

zusätzlich TZR und CD28 stimulierten Zellen verstärkte die STAT1 und 3 Phosphorylierung deutlich. Die Inkubation mit Zellkulturüberstand von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die durch CD3 und CD28 Kreuzvernetzung in Abwesenheit von poly(I:C) stimuliert wurden, führte dagegen erst nach 24 Stunden zur Phosphorylierung von STAT1 und 3.

Weder Typ I IFN noch IFN- $\gamma$  waren nach alleiniger TLR3 Stimulation im Überstand von CD4<sup>+</sup> T Zellen nachweisbar. Auch die Expression aller anderen untersuchten Zytokine und Chemokine wurden durch poly(I:C) allein nicht aktiviert. Da aber die Induktion der Expression von Typ I IFN nach TLR3 Stimulation gut charakterisiert ist und die Aktivierung von STAT1 durch Typ I IFN erfolgt, erscheint es möglich, dass die beobachtete STAT1 Phosphorylierung durch Typ I IFN hervorgerufen wurde. Die Typ I IFN Produktion konnte aber nur in geringem Umfang erfolgt sein, da Typ I IFN im Überstand von CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht nachweisbar waren.

Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk induzierte die Expression zahlreicher Chemokine und Zytokine, darunter IFN- $\gamma$ , was die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 unter diesen Stimulationsbedingungen erklären könnte.

Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 mAk alleine hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von IRF3 bzw. die Transkription von *Irf7*, verstärkte jedoch signifikant die *Irf7* mRNA Menge nach TLR3 Ligation (Abb. 5.16). Dies war so nicht erwartet worden, da bisher keine Regulation von IRF3 durch den TZR-Signalweg beschrieben ist. Eine mögliche Verbindung zwischen den beiden Signalwegen stellt die PI3-Kinase dar. Sowohl der TZR- als auch der TLR3 Signalweg stimulieren die Aktivität dieser Kinase (siehe Abschnitt 1.2.1 und 1.3.2.1). Über die Beteiligung der PI3-K an der IRF3 Regulation gibt es widersprüchliche Publikationen. Sarkar und Kollegen berichten, dass die Inhibition der PI3-K zwar nicht die Kerntranslokation von IRF3, wohl aber die Transkriptionsinitiation des ISG56 Gens in HEK293 Zellen beeinträchtigt [47]. Aksoy und Kollegen berichten, dass die Inhibition der PI3-K dagegen keine Auswirkungen auf die IRF3 abhängige Expression von IFN- $\beta$  in dendritischen Zellen hat [49]. In CD4<sup>+</sup> T Zellen hatte die Inhibition der PI3-K auf die Transkription von *Irf7* allenfalls einen schwach inhibierenden Einfluss, was sich mit den von Aksoy et al publizierten Ergebnissen deckt. Möglicherweise haben die divergierenden Ergebnisse ihre Ursache in der unterschiedlichen Regulation der verschiedenen Gene. Plausibel erscheint aber auch eine zelltypspezifische Regulation von IRF3, da größere Gemeinsamkeiten in der Genregulation zwischen Zellen des Immunsystems eher zu erwarten sind, als mit Hek293 Zellen, also ursprünglich embryonalen Zellen. Eine Beteiligung der PI3-K an der Regulation von IRF3 in primären humanen CD4<sup>+</sup> T Zellen erscheint daher eher unwahrscheinlich.



Eine andere mögliche Verbindung zwischen dem TZR Signalweg und IRF3 wird möglicherweise durch die Induktion von Tyrosin Kinasen der Src Familie, wie z.B. Lck und Fyn, nach der TZR Stimulation vermittelt. Für die intrazelluläre Signalweiterleitung nach TLR3 Stimulation ist die Phosphorylierung von TLR3 an verschiedenen Tyrosinen, speziell an Tyrosin759 essentiell [48]. Die beteiligten Kinasen sind bis heute nicht eindeutig identifiziert, als Kandidaten sind aber Mitglieder der Src Familie sehr wahrscheinlich. Johnsen und Kollegen konnten zeigen, dass c-Src nach dsRNA Stimulation mit TLR3 kolokalisiert, und dass in embryonalen Fibroblasten der Maus (MEFs), die defizient für die Src Kinasen Src, Fyn und Yes sind keine Kerntranslokation von IRF3 mehr stattfindet [45]. Aktivierung von Kinasen der Src Familie nach TZR Stimulation könnte also durch eine gesteigerte TLR3 Phosphorylierung die Aktivität von IRF3 verstärken.

## 6.5 Die MAPK Kaskade

In unserer Arbeitsgruppe wurden abhängig von den Stimulationsbedingungen unterschiedliche Effekte von TLR Liganden auf T Zellen beobachtet [9]. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die direkte TLR3 Kostimulation im Vergleich zu einer Präinkubation mit poly(I:C) analysiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Stimulation von TLR3 nur einen schwachen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk1/2 hatte (Abb. 5.27). p38 dagegen wurde nach Stimulation mit poly(I:C) phosphoryliert (Abb. 5.27). Dieser Effekt ließ sich jedoch nur für poly(I:C) vorinkubierten Zellen nachweisen. In direkt stimulierten Zellen war eine umfassende, unspezifische p38 Phosphorylierung zu beobachten, was auch nach einminütiger Stimulation der vorinkubierten Zellen der Fall war (Abb. 5.27). Dieser Stimulus unabhängige Phosphorylierung von p38 ist vermutlich auf den Temperaturunterschied zurückzuführen, welchem die Zellen ausgesetzt waren. Während vorinkubierte Zellen im Brutschrank inkubiert wurden und vor der Stimulation nur kurz auf Eis gelagert wurden, wurden direkt stimulierte Zellen über den gleichen Zeitraum bei 4°C gelagert. Der Temperaturunterschied, dem direkt stimulierte Zellen ausgesetzt waren, war also deutlich größer. Es ist in der Literatur beschrieben, dass p38 durch verschiedenste Arten von Stress, wie radikale Sauerstoffspezies, osmotischen Schock, UV Licht und Hypoxie [95] aktiviert werden kann. Ein weiterer Stressfaktor der zur Aktivierung von p38 führt, ist eine ausgeprägte Temperaturdifferenz [96-98]. Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurde in direkt stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen die Kinase p38 unspezifisch aktiviert. Dies war in

vorinkubierten Zellen nicht der Fall, in diesen Zellen war nach der Präinkubation mit poly(I:C) eine verstärkte p38 Phosphorylierung nachweisbar.

## 6.6 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

Für die Analyse des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wurde die Aktivierung der p65 Untereinheit untersucht, da diese hauptverantwortlich für das Transkriptions-aktivierende Potential von NF- $\kappa$ B ist [99]. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wurde sowohl in Jurkat Zellen, als auch in primären CD4<sup>+</sup> T Zellen untersucht.

### 6.6.1 NF- $\kappa$ B in Jurkat Zellen

In Jurkat Zellen führte TLR3 Kostimulation des TLR Signalwegs zur verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors, gezeigt durch eine verstärkte Expression eines Luciferase Reportergenkonstrukts und des NF- $\kappa$ B regulierten Gens A20 (Abb. 5.20 und 5.22) [48, 100]. Für primäre CD4<sup>+</sup> T Zellen konnte dies in dieser Form nicht gezeigt werden. TLR3 Kostimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert wurden, hatte nur einen schwachen Effekt auf die NF- $\kappa$ Bp65 Aktivierung (Abb. 5.24, 5.25). Auch eine verstärkte Expression von Zielgenen von NF- $\kappa$ B nach TLR3 Kostimulation konnte in primären CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht beobachtet werden (Abschnitt 5.6.3, Abb. 5.23)

Ein möglicher Grund für diese Unterschiede zwischen Jurkat Zellen und direkt stimulierten primären CD4<sup>+</sup> T Zellen ist, dass Jurkat Zellen ähnlich wie vorinkubierte CD4<sup>+</sup> T Zellen permanent im Brutschrank kultiviert wurden und daher zu Beginn der Stimulation keiner starken Temperaturdifferenz ausgesetzt waren. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass es sich bei Jurkat Zellen um eine leukämische T Zelllinie handelt. Diese zeichnet sich unter anderem durch ein unbegrenztes proliferatives Potenzial aus. Der Erwerb dieser Eigenschaft geht mit veränderter Regulation verschiedener intrazellulärer Signalwege einher. So ist in Jurkat Zellen Itk im Gegensatz zu primären CD4<sup>+</sup> T Zellen konstitutiv mit der Zellmembran assoziiert (siehe 1.2.1) und die Kinase Akt liegt ebenfalls dauerhaft in einer phosphorylierten Form vor [101]. Ein Beispiel für unterschiedliches Verhalten von Jurkat Zellen und primären CD4<sup>+</sup> T Zellen ist, dass die Stimulation des TLR Signalwegs bei Jurkat Zellen des im

Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Subklons JE6.1, nicht die Produktion von IL-2 induzierte (Daten nicht gezeigt). Bei primären CD4<sup>+</sup> T Zellen war dies der Fall.

#### 6.6.2 Die Transkription NF- $\kappa$ B regulierter Gene

In primären CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde der NF- $\kappa$ B Signalweg durch Westerblotanalysen, qRT-PCR Experimente und die Phosflow™ Methode untersucht. In direkt stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen konnte hiermit die Phosphorylierung von NF- $\kappa$ Bp65 bzw. die Transkription der durch NF- $\kappa$ B regulierten Gene *Csf-2* und *Icam-1* nach Aktivierung des TZR Signalwegs gezeigt werden.

Die Transkription von *Csf-2* und *Icam-1* ist abhängig von der Aktivierung von NF- $\kappa$ Bp65 [102, 103] und wurde in CD4<sup>+</sup> T Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk induziert (Abschnitt 5.6.3, Abb. 5.23). Ein verstärkender Einfluss der TLR3 Kostimulation auf die Transkriptionsrate ließ sich nicht eindeutig zeigen. Die Transkription der beiden Gene, sowie der Einfluss von poly(I:C) variierte stark zwischen CD4<sup>+</sup> T Zellen verschiedener Spender. Die Ursache hierfür mag darin liegen, dass neben der Transkriptionsaktivierung durch NF- $\kappa$ B weitere, Stimulus abhängige Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. So ist die *Icam-1* Expression in endothelialen Zellen nach Thrombin- nicht aber nach TNF- $\alpha$  Stimulation unter anderem abhängig von NFAT und dem RhoA Signalweg [103, 104]. Bei der Regulation der Transkription von *Csf-2* und *Icam-1* ist neben NF- $\kappa$ Bp65 auch der Koaktivator p300 beteiligt [105, 106]. Bei p300 handelt es sich um eine Azetyltransferase, die mit p65 interagieren kann [107]. p300 katalysiert die Histon-Azetylierung, welche zu einer Umstrukturierung des Chromatins führt [108] und Voraussetzung für die Bindung von p65 an ein NF- $\kappa$ B response Element im Promotor von *Csf-2* ist [105]. Die Aktivität des Koaktivators p300 wird nach Infektion mit dem Hepatitis C Virus, dem Simian Virus und Adenoviren durch viral exprimierte Proteine beeinflusst [109-111]. Das Blut, aus dem in der hier vorliegenden Arbeit CD4<sup>+</sup> T Zellen isoliert wurden, wurde routinemäßig auf Infektion mit dem Humanen Immundefizienz Virus, Hepatitis A, B, und C, dem Zytomegalievirus und dem Parvovirus B19 untersucht. Eine Infektion mit anderen Viren kann jedoch prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Die Variabilität der Expression der beiden Gene in CD4<sup>+</sup> T Zellen von verschiedenen Spendern könnte folglich von viralen Infektionen der Spender herrühren.

Die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk aktivierte die Transkription von *Csf-2* und *Icam-1*. Über eine modulierende Rolle der TLR3 Stimulation auf

die Transkription und somit auf die NF- $\kappa$ Bp65 Aktivität lieferten die qRT-PCR Experimente Hinweise, aber keine eindeutigen Belege.

### 6.6.3 Die Phosphorylierung von NF- $\kappa$ Bp65

Neben der Rekrutierung des Kofaktors p300 ist auch die Aminosäure an der p65 phosphoryliert wird, ausschlaggebend für die Aktivität als Transkriptionsfaktor. NF- $\kappa$ Bp65 kann an den Aminosäuren Serin 276, Serin 311, Threonin 435, Serin 468, Serin 529, Serin 536 und Threonin 505 phosphoryliert werden [112-115]. Am besten charakterisiert ist die Rolle der p65 Phosphorylierung an Serin 529 und Serin 536. Beide Serine liegen in der Rel Homologie Domäne (RHD), die sowohl für die Dimerisierung, als auch die DNA Bindung essentiell ist. Beide Aminosäuren sind zwischen Mensch und Maus konserviert [116], was auf ihre Bedeutung für die Funktion von p65 hinweist. Die Rolle der beiden Phosphorylierungsstellen für die Wirkung von NF- $\kappa$ Bp65 scheint abhängig von der Zellpopulation und dem jeweiligen Stimulus zu sein. In MEFs ist die Transkription von E-Selektin [117] abhängig von der TNF- $\alpha$  induzierten Phosphorylierung von p65 an Serin 536. Für die Rolle der Serin 536 Phosphorylierung bei der Transkription von *Csf-2* sind widersprüchliche Ergebnisse publiziert. Nach Sasaki et al. erfolgt in MEFs nach TNF Stimulation ohne Serin 536 Phosphorylierung keine *Csf-2* Transkription [102], während nach Moreno et al. in TNF stimulierten MEFs die Phosphorylierung an Serin 536 einen dämpfenden Einfluss auf die *Csf-2* und auch auf die *Icam-1* Transkription hat [118]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse beruhen möglicherweise auf einer unterschiedlichen Einsatzkonzentration des TNF oder der Verwendung unterschiedlicher MEF Linien. p65 Phosphorylierung an Serin 529 konnte dagegen nach TNF Stimulation in Hela Zellen nachgewiesen werden [119]. Im Zusammenhang mit der T Zellaktivierung scheint die Serin 536 Phosphorylierung von größerer Bedeutung für die Funktion von NF- $\kappa$ B zu sein, da Mattioli und Kollegen berichteten, dass Serin 536 und nicht Serin 529 die Hauptphosphorylierungsstelle von NF- $\kappa$ Bp65 in Jurkat Zellen nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk ist [116].

Die Phosphorylierung an Serin 529 und Serin 536 wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durch Westernblotanalysen und die Phosflow™ Methode untersucht. Der mAk, der für die in Abschnitt 5.6.4 präsentierten Westernblotanalysen verwendet wurde, erkannte NF- $\kappa$ Bp65, das an Serin 536 phosphoryliert war. An Serin 529 phosphoryliertes NF- $\kappa$ B wurde dagegen durch den mAk erkannt, der für die Phosflow™ Methode verwendet wurde

(Abschnitt 5.6.5). Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) präinkubiert wurden, konnte nach TLR3 Kostimulation kein eindeutiger Effekt auf die p65 Phosphorylierung an Serin 529 in TZR und TZR/CD28 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen gezeigt werden. Nach einminütiger Stimulation ließ sich in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die nicht im Brutschrank vorinkubiert wurden, sowohl an Serin 529 (durch Phosflow™, Abb. 5.25 und 5.26) als auch an Serin 536 (durch Westernblot, Abb. 5.24) die Phosphorylierung von p65, auch unabhängig von der Stimulation des TZR, nachweisen. Die p65 Phosphorylierung an Serin 529 war auch nach 30-minütiger Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk in direkt stimulierten, zuvor bei 4°C gelagerten CD4<sup>+</sup> T Zellen, deutlich ausgeprägter als in präinkubierten Zellen (Abb. 5.25). Die verstärkte p65 Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die nicht im Brutschrank vorinkubiert wurden, ist unter Umständen auf die unspezifische Aktivierung p38 durch Hitzeschock in diesen Zellen zu erklären. Der Einfluss von p38 auf NF-κB ist nicht abschließend geklärt, zahlreiche Publikationen beschreiben aber eine Aktivierung von NF-κBp65 durch p38 [120-125]. Eine erhöhte p38 Aktivität könnte die Ursache für eine verstärkte p65 Phosphorylierung an Serin 529 und Serin 536 in direkt stimulierten Zellen sein und so auch einen möglichen kostimulatorischen Effekt von poly(I:C) maskieren.

Die Vorinkubation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) verstärkte die p65 Phosphorylierung sowohl an Serin529, als auch an Serin536 nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk im Vergleich zu Zellen, die in Medium vorinkubiert wurden (Abb. 5.24, 5.25 und 5.26). Dabei war nach einer Stimulationsdauer von 30 Minuten der kostimulatorische Effekt der poly(I:C) Präinkubation stärker als nach CD28 Kostimulation (Abb. 5.24 und 5.25). Phosphorylierung an Serin536 wurde im Westernblot auch nach poly(I:C) Präinkubation ohne zusätzlichen TZR Stimulus beobachtet. Die Phosphorylierung von p65 an Serin529 wurde im Gegensatz dazu durch Präinkubation mit poly(I:C) alleine nicht induziert. Diese Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass an der Phosphorylierung von Serin 529 und Serin 536 unterschiedliche Kinasen beteiligt sind. Die Phosphorylierung von Serin 529 erfolgt durch die Casein Kinase II (CKII) [126, 127], während Serin 536 durch IKKα, IKKβ, [128] und interessanterweise auch durch IKKε [129] phosphoryliert werden kann. IKKε ist auch an der Transduktion des IRF3 Signalwegs beteiligt und wird nach Stimulation von TLR3 zu TRIF rekrutiert (siehe 1.3.2.1).

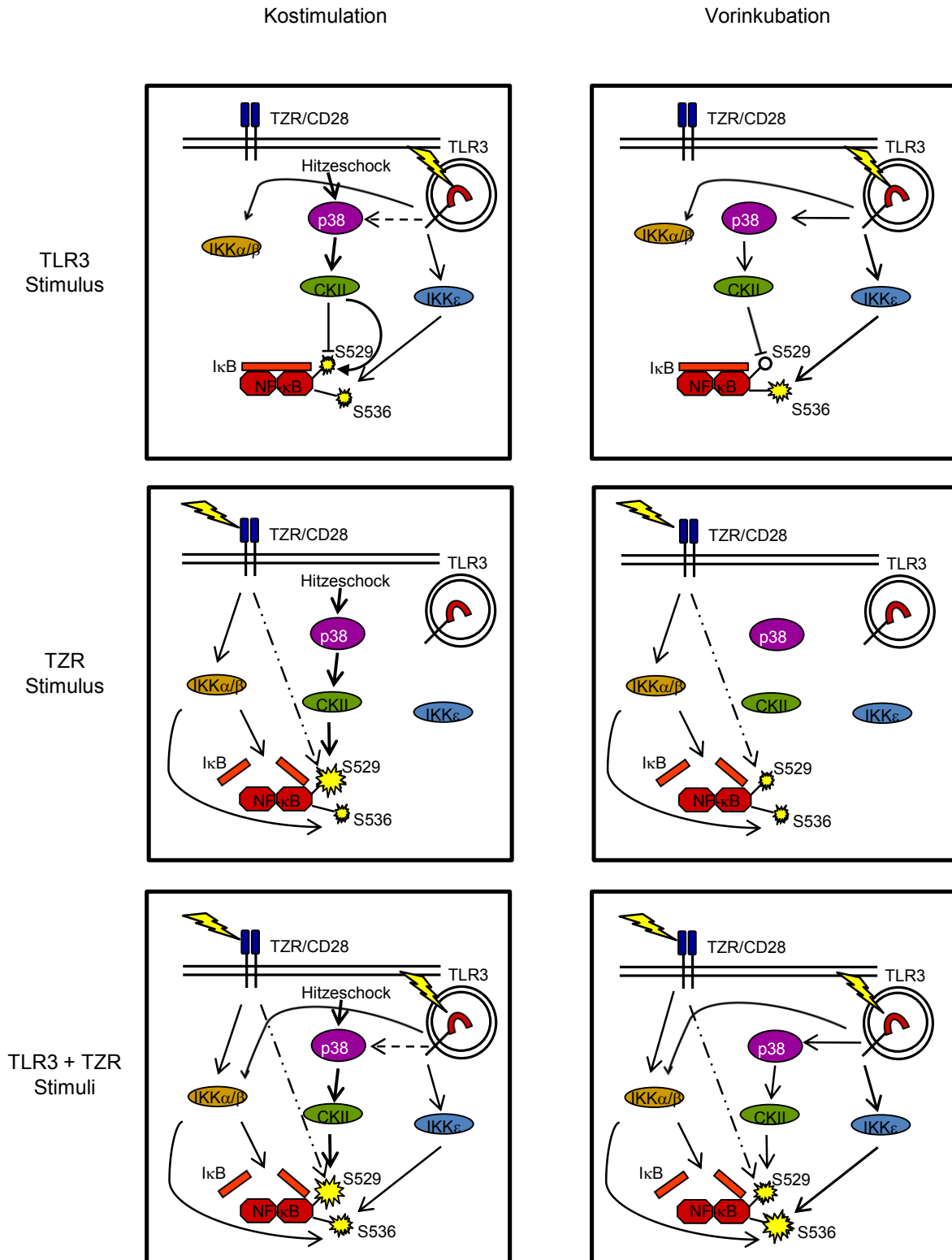
Auf die Degradation von IκB-α hatte die Vorinkubation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) alleine keinen Einfluss (Abb. 5.24, rechts). Wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert, war die IκB-α Degradation in Zellen, die mit poly(I:C) vorinkubiert wurden deutlich verstärkt (Abb. 5.24, rechts). Die Degradation von IκB-α war

also keine Voraussetzung für die Phosphorylierung von p65 an Serin 536, was sich mit Ergebnissen von Mattioli et al. deckt, wonach die p65 Phosphorylierung in Jurkat Zellen nach Stimulation mit CD3 und CD28 mAk innerhalb des intakten NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B Komplexes erfolgt [116]. Die Phosphorylierung an Serin 529 und Serin 536 war nach CD3 und CD28 Kreuzvernetzung in vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen deutlich geringer (Abb. 5.24, rechts, Abb. 5.25, B und D), als in direkt stimulierten Zellen (Abb. 5.24, links, Abb. 5.25, A und C). Der kostimulatorische Effekt, der nach Präinkubation mit poly(I:C) beobachtet wurde, trat also im Vergleich zu einer geringeren Phosphorylierung in mit Medium vorinkubierten Zellen auf. Eine Minute nach Beginn der Stimulation war zwar auch in vorinkubierten Zellen eine Stimulus unabhängige Phosphorylierung an Serin 536 beobachten, diese klang jedoch rasch ab und war nach 30 Minuten nur noch in poly(I:C) vorinkubierten Zellen zu beobachten (Abb. 5.24, rechts).

#### 6.6.4 Modell der NF- $\kappa$ B Phosphorylierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen

Für die Regulation von NF- $\kappa$ B in CD4<sup>+</sup> T Zellen lässt sich an Hand der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit folgendes Modell entwerfen (Abb. 6.1):

Für p65 Serin 529 Phosphorylierung war die Stimulation des TZR Signalwegs Voraussetzung. Die Induktion der Phosphorylierung an dieser Aminosäure durch den TZR ist bisher nicht beschrieben. Die Aktivierung von p38 nach TLR3 Stimulation oder möglicherweise durch Hitzeschock korrelierte mit einer verstärkten Phosphorylierung an Serin 529. Serin 529 Phosphorylierung könnte durch Interaktion und verstärkte Aktivierung der CKII durch p38 vermittelt worden sein [130]. In nicht TZR stimulierten Zellen könnte die Serin 529 Phosphorylierung durch Interaktion von CKII mit I $\kappa$ B- $\alpha$  unterbunden worden sein, ein Regulationsmechanismus der auch von Sodhi et al diskutiert wird [131]. Dagegen spricht, dass nach kurzer Stimulationsdauer in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die einem Hitzeschock ausgesetzt waren, Serin 529 auch unabhängig von der Stimulation des TZR phosphoryliert wurde (Abb. 5.25 A). Möglicherweise wurde in diesen Zellen p38 so stark aktiviert, dass eine Inhibition durch I $\kappa$ B- $\alpha$  überkommen werden konnte. Darüber hinaus konnte eine eindeutig verstärkte I $\kappa$ B- $\alpha$  Degradierung nach TZR Stimulation von uns nicht gezeigt werden. Nach poly(I:C) Präinkubation korrelierten jedoch verstärkte I $\kappa$ B- $\alpha$  Degradation und Serin 529 Phosphorylierung (Abb. 5.24 und 5.25). Phosphorylierung von p65 an Serin 536 erfolgte sowohl nach TZR Stimulation, als auch nach poly(I:C) Stimulation unabhängig davon, ob p65



**Abb. 6.1: Modell der NF-κBp65 Phosphorylierung nach poly(I:C) Stimulation.** Links: poly(I:C) kostimierte CD4<sup>+</sup> T Zellen, rechts: poly(I:C) vorinkubierte Zellen. Stimulation über den TLR3 oder TZR und CD28 ist als ⚡ angegeben. Phosphorylierung ist als ☀ dargestellt, unterschiedliche Größen stellen verschiedene Phosphorylierungsgrade dar. Gestrichelte Linien geben Regulationsmechanismen an, für die sich in der Literatur keine Anhaltspunkte finden lassen.

mit I $\kappa$ B- $\alpha$  assoziiert war oder nicht. Als Kinasen kommen IKK $\alpha$  und  $\beta$ , die nach TZRstimulation aktiviert werden und IKK $\epsilon$ , die über den TLR3 Signalweg aktiviert wird [53], in Frage.

In direkt stimulierten Zellen war eine Inkubationsdauer von 30 Minuten mit poly(I:C) möglicherweise zu gering, um eine verstärkte Phosphorylierung auszulösen. Nach 3-tägiger Stimulation mit anti-CD3 mAk bewirkte poly(I:C) Kostimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen dann auch eine verstärkte p65 Phosphorylierung an Serin 529, ein Effekt der in anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen dagegen nicht nachzuweisen war. Ursache hierfür war möglicherweise eine Desensibilisierung des NF- $\kappa$ B oder des p38 Signalwegs, wie von Dorion et al. für p38 nach Hitzeschock beschrieben [96].

## 6.7 Model der Regulation der Zytokin und Chemokinproduktion

Die Auswirkung der TLR3 Stimulation auf die Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- $\kappa$ B liefert eine Erklärung für das beobachtete Zytokin und Chemokinexpressionsprofil von CD4<sup>+</sup> T Zellen. Nach poly(I:C) Stimulation allein wurde zwar IRF3 aktiviert, NF- $\kappa$ B dagegen nicht. Es konnte zwar die Phosphorylierung von p65 an Serin 536 nachgewiesen werden, der NF- $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$  wurde aber nicht degradiert, sodass p65 nicht als Transkriptionsaktivator wirken konnte. Es ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B eine wesentliche Rolle bei der Produktion von MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES, IP-10, IFN- $\gamma$ , IL-8 und TNF- $\alpha$  spielt [132-136]. Folgerichtig erfolgte die Produktion dieser Proteine erst nach Stimulation des TLR Signalwegs und der damit einhergehenden NF- $\kappa$ B Aktivierung.

Ein verstärkender Effekt von poly(I:C) auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die parallel zur Stimulation mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 mAk mit poly(I:C) stimuliert wurden, ließ sich nicht zeigen (Abschnitt 5.6.3 – 5.6.5). Als Ursache für die verstärkte Zytokin und Chemokin Produktion von TLR3 kostimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen kommt daher eher die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 als eine gesteigerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Betracht. Es ist bekannt, dass neben NF- $\kappa$ B auch IRF3 an der Regulation von MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES und IP-10 beteiligt ist [71, 132]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die verstärkte Produktion von MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES und IP-10 nach TLR3 Kostimulation gezeigt werden (Abb. 5.11). Der kostimulatorische Effekt von poly(I:C) war in diesem Zusammenhang stärker ausgeprägt als der über CD28 vermittelte Kostimulus. Parallele Kostimulation über TLR3 und CD28 hatte einen synergistischen Effekt. Eine Beteiligung von



IRF3 an der Expression von MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES und IP-10 würde auch diese Ergebnisse erklären.

Für die IL-8 und TNF- $\alpha$  Expression ist dagegen keine Beteiligung von IRF3 beschrieben. Doyle und Kollegen berichteten, dass TNF- $\alpha$  einerseits und RANTES und IP-10 andererseits in murinen Makrophagen unterschiedlich reguliert werden [132]. Nach Doyle wurde TNF- $\alpha$  in murinen Makrophagen nach Stimulation von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 exprimiert. RANTES und IP-10 konnten nur durch Stimulation von TLR3 und TLR4 aktiviert werden. Alle TLRs aktivierten in den Makrophagen den NF- $\kappa$ B Signalweg, während IRF3 nur nach TLR3 und TLR4 Stimulation aktiviert wurde. IRF3 war also an der Regulation von RANTES und IP-10, nicht aber an der von TNF- $\alpha$  beteiligt. Dies erklärt warum TNF- $\alpha$  von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert und mit poly(I:C) kostimuliert wurden, nicht verstärkt exprimiert wurde (Abb. 5.28 A). Die TLR3 Kostimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die nur durch anti-CD3 mAk aktiviert wurden, bewirkte dagegen eine gesteigerte TNF- $\alpha$  Produktion (Abb. 5.28 A). Unter diesen Stimulationsbedingungen ließ sich nach dreitägiger Stimulation auch eine verstärkte NF- $\kappa$ Bp65 Phosphorylierung nachweisen (Abb. 5.26).

Die Präinkubation mit poly(I:C) bewirkte eine verstärkte Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die durch CD3 oder CD3 und CD28 Kreuzvernetzung stimuliert wurden (Abb. 5.24 – 5.26). Übereinstimmend mit den obigen Überlegungen wurde unter diesen Bedingungen auch eine verstärkte TNF- $\alpha$  Produktion festgestellt (Abb. 5.28).

Auffällig waren die Unterschiede der TNF- $\alpha$  und speziell der IFN- $\gamma$  Produktion zwischen vorinkubierten und nicht vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen. CD4<sup>+</sup> T Zellen, die vor der Stimulation unterschiedlich gelagert (Lagerung bei 4°C von nicht vorinkubierten Zellen, Inkubation im Brutschrank von vorinkubierten Zellen) aber sonst unter identischen Bedingungen mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert wurden, zeigten zum Teil drastische Unterschiede in der Zytokinproduktion. Nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk war im Überstand von nicht vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen durchschnittlich fast zehnmal so viel IFN- $\gamma$  nachweisbar als bei vorinkubierten Zellen. Die Unterschiede der TNF- $\alpha$  Produktion waren nicht so ausgeprägt, aber immer noch deutlich (Abb. 5.28). Eine mögliche Ursache für die gesteigerte Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in nicht vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen, könnte eine verstärkte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in diesen Zellen sein. Eine Beteiligung der unspezifischen, zellstressinduzierten p38 Aktivierung an der verstärkten Zytokinproduktion käme in Frage. Campbell et al. berichten von einer p38 vermittelten NF- $\kappa$ B Aktivierung, welche die TNF- $\alpha$  Produktion in humanen Makrophagen induziert [121]. Auch für IFN- $\gamma$  ist eine Regulation durch p38 in der Maus beschrieben [137]. Eine verstärkte p38 Aktivierung

nach der Präinkubation mit poly(I:C), könnte auch die vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion in CD4<sup>+</sup> T Zellen erklären.

## 6.8 Einfluss von TLR3 auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen

Die Expression des CD28 Korezeptors auf der Zelloberfläche wurde durch PHA Stimulation verstärkt. Präinkubation mit poly(I:C) steigerte die CD28 Expression im Vergleich zu Präinkubation in Medium (Abschnitt 5.8.1, Abb. 5.29).

CD28 Kostimulation hat über die Aktivierung der Kinase PDK-1 und Assemblierung des CBM Komplexes Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [138]. Der Einfluss von poly(I:C) auf die Expression von CD28 in CD4<sup>+</sup> T Zellen korrelierte mit der p65 Phosphorylierung an Serin 529 (Abb. 5.25). Die gesteigerte Expression von CD28 in präinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen kam somit als weiterer Mechanismus in Betracht, der an der erhöhten Aktivierung, bzw. Phosphorylierung von p65 an Serin 529 nach poly(I:C) Präinkubation beteiligt sein könnte. Bei der Regulation des PI3-K/Akt Signalwegs spielt die CD28 Kostimulation ebenfalls eine Rolle [139]. Wie bei NF- $\kappa$ B korrelierte der Einfluss von poly(I:C) auf die CD28 Expression in präinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen mit der Phosphorylierung von Akt (Abb. 5.30) und liefert so eine mögliche Erklärung für den unterschiedlichen Einfluss von poly(I:C) auf die Akt Phosphorylierung in vorinkubierten *versus* kostimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen. Neben dem Einfluss von Akt auf die Translation von ISGs steigert der Akt Signalweg auch den Zellmetabolismus und die Proliferation [140].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Lagerungsbedingungen von CD4<sup>+</sup> T Zellen wesentlichen Einfluss auf deren Proliferation hatten. CD4<sup>+</sup> T Zellen, die vor der Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk bei 4°C gelagert wurden, proliferierten deutlich stärker, als Zellen, die im Brutschrank gelagert wurden. Nach einer Stimulationsdauer von 5 Tagen war die Proliferationsrate dieser Zellen im Durchschnitt viermal so hoch, wie die Proliferationsrate von Zellen, die im Brutschrank gelagert wurden (Abb. 5.31). Auch hier ist die unspezifische p38 Aktivierung in CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert wurden als Ursache wahrscheinlich. So berichten Yu und Mitarbeiter, dass in Jurkat Zellen stressinduzierte p38 Aktivierung die Zellproliferation auslöst [141]. Dies könnte auch erklären, warum für CD4<sup>+</sup> T Zellen, die einer starken Temperaturdifferenz ausgesetzt wurden, die Stimulation des TZR Signalwegs ohne zusätzlichen CD28 Kostimulus ausreichend war, um die Proliferation zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 37°C gelagert wurden, war

dagegen abhängig von der CD28 Kostimulation. Poly(I:C) konnte in diesem Zusammenhang CD28 nicht ersetzen (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss von poly(I:C) auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen ist abhängig davon, ob die Zellen bei 4°C oder im Brutschrank gelagert wurden, und davon ob die Zellen mit poly(I:C) präinkubiert oder kostimuliert wurden. Die poly(I:C) Kostimulation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert wurden, verringerte die Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk (Abb. 5.31 A und C). Die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die im Brutschrank gelagert wurden, wurde durch TLR3 Stimulation verstärkt. Diese Resultate korrelieren mit dem Phosphorylierungsprofil von Akt in CD4<sup>+</sup> T Zellen (Abb. 5.30). Die proliferationssteigernde Wirkung von poly(I:C) war ausgeprägter, wenn CD4<sup>+</sup> T Zellen mit dem TLR3 Ligand vorinkubiert wurden, als wenn sie parallel zur CD3 und CD28 Kreuzvernetzung mit poly(I:C) kostimuliert wurden (Abb. 5.33). Die proliferationssteigernde Wirkung von poly(I:C) war durch Mitglieder unserer Arbeitsgruppe auch schon für  $\gamma\delta$  T Zellen beschrieben worden [27].

Wie die gesteigerte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert wurden, wird auch die proliferationsfördernde Wirkung von poly(I:C) auf Zellen, die zuvor im Brutschrank gelagert wurden, möglicherweise durch die Aktivierung von p38 vermittelt [141]. CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) vorinkubiert wurden, wiesen eine stark erhöhte p38 Phosphorylierung auf (Abb. 5.27).

Als Ursache für eine verringerte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen, die bei 4°C gelagert und mit poly(I:C) kostimuliert wurden, kommen verschiedene Faktoren in Frage. Zum einen die bereits angesprochenen Abnahme der Akt Phosphorylierung (Abb. 5.30). Darüber hinaus ist der negative Effekt der poly(I:C) Kostimulation auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen möglicherweise auf die extrem gesteigerte IFN- $\gamma$  Produktion zurückzuführen (Abb. 5.28). Krenger et al. berichten z.B., dass IFN- $\gamma$  die T Zellproliferation hemmen kann [142]. Dies würde voraussetzen, dass die Menge des von vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen sezernierten IFN- $\gamma$  zu gering war um die Proliferation zu beeinflussen. Sonst wäre auch hier eine verringerte Proliferation von poly(I:C) vorinkubierten im Vergleich zu in Medium vorinkubierten CD4<sup>+</sup> T Zellen zu erwarten gewesen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die verstärkte Granzym B Expression in poly(I:C) kostimulierten Zellen (Abb. 5.9) die Proliferation negativ beeinflusst. Granzym B ist eine Serin Protease, deren Expression im Gegensatz zu anderen Granzymen in humanen Lymphozyten durch Stimulation mit anti-CD3 mAk oder IL-2 induziert wird [143]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TLR3 Kostimulation die Expression massiv steigerte. Granzym B hat pro-apoptotische

Funktionen, die durch die Spaltung der Caspasen 3 und 8 [144] sowie den Cytochrom C/Apaf-1 Weg vermittelt werden [145]. Gesteigerter Zelltod konnte nach TZR/TLR3 Kostimulation in CD4<sup>+</sup> T Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.10). In den letzten Jahren wurden neben der Induktion von Apoptose zahlreiche weitere, antivirale Eigenschaften von Granzym B beschrieben. Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM), wie Fibronectin und Laminin, stellen Substrate von Granzym B dar [146]. Umbau und teilweise Degradation der EZM durch Granzym B könnte einen Mechanismus darstellen, der die Migration von Lymphozyten zu Infektionsherden erleichtert [145]. Weitere Substrate von Granzym B stellen intrazelluläre Proteine dar, die für die virale Replikation oder auch die Proliferation von Tumorzellen direkt oder indirekt von Bedeutung sind, darunter die Topoisomerase I und die RNA-Polymerase II [69]. Die Spaltung dieser zellulären Komponenten würde nicht nur die virale Replikation, sondern auch die Proliferation der Wirtszelle unterbinden, oder zumindest verlangsamen. Die Granzym B Expression durch CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit poly(I:C) vorinkubiert wurden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, sodass keine Aussagen über die Korrelation der Granzym B Expression mit der Proliferation von vorinkubierten Zellen getroffen werden können.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen das Erkennen einer viralen Infektion durch Stimulation von TLR3 die CD4<sup>+</sup> T Zellreaktion maßgeblich beeinflussen kann. Als Reaktion auf eine Infektion mit Viren zieht die Stimulation von TLR3 eine drastisch gesteigerte Produktion von antiviralen Zytokinen und Chemokinen nach Ligation des TZR nach sich. Für diesen Vorgang sind TLR3 stimulierte CD4<sup>+</sup> T Zellen nicht auf Kostimulation durch APZ angewiesen. Vielmehr erwies sich die Kostimulation über TLR3 für die Ausschüttung zahlreicher antiviraler Zytokine und Chemokine als potenter als CD28 Kostimulation. Für die klonale Expansion von CD4<sup>+</sup> T Zellen wäre, nach den hier vorliegenden Daten, die CD28 Kostimulation des TZR Signalwegs Voraussetzung. Nach einer viralen Infektion könnte die Ligation von TLR3 die TZR/CD28 induzierte Proliferation weiter steigern.

## 7 Zusammenfassung

### 7.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass  $CD4^+$  T Zellen aus dem peripheren Blut Toll-like Rezeptor (TLR) 3 exprimieren und über diesen Rezeptor poly(I:C) erkennen.

Die TLR3 Stimulation allein hatte keinen Einfluss auf die Produktion von Granzym B sowie von proinflammatorischen und antiviralen Zytokinen und Chemokinen. Der TLR3 Ligand hatte jedoch einen kostimulatorischen Effekt auf die T-Zellrezeptor (TZR)- bzw. TZR/CD28 induzierten Signalwege. Die TLR3 Kostimulation war dabei für die Produktion von  $IFN-\gamma$ , IP-10, RANTES, MIP1- $\alpha$  und MIP1- $\beta$  durch  $CD4^+$  T Zellen wirksamer als die CD28 Kostimulation. Kostimulation des TZR Signalwegs sowohl über CD28 als auch über TLR3 steigerte die Produktion von  $IFN-\gamma$  und der aufgeführten Chemokine nochmals. Dies deutet daraufhin, dass bei einer viralen Infektion die Produktion von antiviralen Zytokinen und Chemokinen ohne gleichzeitige Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen erfolgen kann. Vermittelt wurde die verstärkte Produktion der meisten Zytokine und Chemokine vermutlich durch die Kooperation der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF3. Für die vollständige Aktivierung von NF- $\kappa$ B war eine Stimulation des TZR Voraussetzung, während IRF3 nach poly(I:C) Stimulation aktiviert wurde.

Neben einer gesteigerten  $IFN-\gamma$  Produktion ging die Kostimulation von  $CD4^+$  T Zellen über TLR3 mit einer verstärkten Expression von TIM-3 einher. Dies wies auf eine vermehrte Differenzierung von naiven  $CD4^+$  T Zellen in Richtung Th1 Zellen hin.

Die Analyse der zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege wurde dadurch erschwert, dass die ursprünglich gewählten Versuchsbedingungen zu einer unspezifischen Aktivierung der Kinase p38 in  $CD4^+$  T Zellen führten.  $CD4^+$  T Zellen, die bei 4°C gelagert wurden und so zu Versuchsbeginn einer großen Temperaturdifferenz ausgesetzt waren, reagierten Stimulus unabhängig mit einer verstärkten Phosphorylierung von p38 und NF- $\kappa$ B. Außerdem konnte im Vergleich zu  $CD4^+$  T Zellen, die bei 37°C im Brutschrank gelagert wurden, nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk eine verstärkte Akt Phosphorylierung sowie eine gesteigerte Proliferation nachgewiesen werden.

Der Einfluss von poly(I:C) unterschied sich zum Teil drastisch zwischen  $CD4^+$  T Zellen, die bei 4°C oder im Brutschrank gelagert wurden. In  $CD4^+$  T Zellen, die bei 4°C gelagert wurden, hatte die Kostimulation mit poly(I:C) nur einen schwachen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B und p38

Phosphorylierung. Die Proliferation sowie die Akt Phosphorylierung wurde durch poly(I:C) verringert. Im Gegensatz dazu bewirkte die Präinkubation von CD4<sup>+</sup> T Zellen mit poly(I:C) im Brutschrank eine gesteigerte p38, NF-κB und Akt Phosphorylierung sowie Proliferation nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk. Kostimulation des TZR Signalwegs über TLR3 konnte den CD28 Kostimulus bei der Induktion der Proliferation nicht ersetzen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass Stimulation von TLR3 die CD4<sup>+</sup> T Zellaktivierung maßgeblich beeinflusst. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stimulation von TLR3 die antivirale Aktivität von CD4<sup>+</sup> T Zellen verstärkt und zum Teil die Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen ersetzen kann.

## 7.2 Summary

The aim of the present thesis was to characterize Toll-like receptor (TLR) 3 expression and its functional relevance in freshly isolated human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T-cells. We were able to confirm that CD4<sup>+</sup> T cells express TLR3 and recognize poly(I:C) *via* this receptor.

The stimulation of TLR3 on its own did not influence the expression and production of granzyme B or proinflammatory and antiviral cytokines/chemokines, but rather enhanced T cell receptor (TCR) and TCR/CD28 induced signaling pathways. The costimulation of the TCR with poly(I:C) increased the production of IFN- $\gamma$ , IP-10, RANTES, MIP1- $\alpha$  and MIP1- $\beta$  more extensively than costimulation with anti-CD28 mAb. Combined TCR costimulation *via* TLR3 and CD28 further increased IFN- $\gamma$  and chemokine levels. These results suggest that the production of antiviral mediators by CD4<sup>+</sup> T cells may be independent of antigen presenting cell (APC)-mediated costimulation. The cooperation of the transcription factors IRF3 and NF- $\kappa$ B seemed to be critical for the enhanced production of cytokines and chemokines. Stimulation of the TCR was the prerequisite for complete NF- $\kappa$ B activation while IRF3 was activated upon TLR3 stimulation alone.

Beside enhanced IFN- $\gamma$  production, TLR3 costimulation was accompanied by an elevated TIM-3 expression, suggesting an augmented differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells towards Th1 cells.

Analysis of the signaling pathways was hampered by an unspecific activation of p38 kinase by the originally chosen experimental setup. Temperature differences between the experimental (37°C) and the storage conditions (4°C) led to phosphorylation of p38 and NF- $\kappa$ B independently of CD4<sup>+</sup> T cell stimulation. Additionally, the Akt phosphorylation and the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells upon TCR and TCR/CD28 stimulation was enhanced in CD4<sup>+</sup> T cells stored at 4°C when compared to cells stored at 37°C.

The effect of poly(I:C) differed substantially between CD4<sup>+</sup> T cells stored at different temperatures. Proliferation and Akt phosphorylation was reduced and NF- $\kappa$ B and p38 phosphorylation was only weakly influenced by TLR3 stimulation in cells stored at 4°C, whereas CD4<sup>+</sup> T cells preincubated at 37°C responded to poly(I:C) with an enhanced proliferation and increased phosphorylation of p38, NF- $\kappa$ B and Akt. In respect to proliferation TCR costimulation with poly(I:C) could not substitute for CD28 costimulation.

Taken together, the results of this thesis show that TLR3 stimulation significantly influences the CD4<sup>+</sup> T cell response. The results indicate that stimulation of TLR3 strongly enhances the

antiviral activity of CD4<sup>+</sup> T cells and, to some extent, substitutes for costimulation mediated by APCs.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;227:221-33.
2. Anderson MS, Su MA. Aire and T cell development. *Curr Opin Immunol* 2011;23:198-206.
3. Segura E, Villadangos JA. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr Opin Immunol* 2009;21:105-10.
4. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1357-66.
5. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-89.
6. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218-22.
7. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8-27.
8. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
9. Oberg HH, Ly TT, Ussat S, Meyer T, Kabelitz D, Wesch D. Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands. *J Immunol* 2010;184:4733-40.
10. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:591-619.
11. Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA. SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 2006;6:67-78.
12. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:320-44.
13. Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-34.
14. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:837-48.
15. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-63.
16. Savignac M, Mellstrom B, Naranjo JR. Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch* 2007;454:523-33.

17. Sioud M, Floisand Y. TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response. *Eur J Immunol* 2007;37:2834-46.
18. Narayan P, Holt B, Tosti R, Kane LP. CARMA1 is required for Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation in T cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:2327-36.
19. Vang T, Abrahamsen H, Myklebust S, et al. Knockdown of C-terminal Src kinase by siRNA-mediated RNA interference augments T cell receptor signaling in mature T cells. *Eur J Immunol* 2004;34:2191-9.
20. Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 2003;4:248-54.
21. Eitelhuber AC, Warth S, Schimmack G, et al. Dephosphorylation of Carma1 by PP2A negatively regulates T-cell activation. *EMBO J* 2011;30:594-605.
22. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 2006;24:65-97.
23. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* 2006;203:1413-8.
24. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
25. Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:1364-9.
26. Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:1733-40.
27. Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krengel K, Kabelitz D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *J Immunol* 2006;176:1348-54.
28. Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* 2006;80:5059-64.
29. Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Akazawa T, Yamamoto A, Seya T. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol* 2004;16:1143-54.
30. Nishiya T, Kajita E, Miwa S, Defranco AL. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem* 2005;280:37107-17.

31. Tabeta K, Hoebe K, Janssen EM, et al. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol* 2006;7:156-64.
32. Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 2007;177:265-75.
33. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008;452:234-8.
34. Fukuda K, Tsujita T, Matsumoto M, et al. Analysis of the interaction between human TLR3 ectodomain and nucleic acids. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2006;249-50.
35. Bell JK, Botos I, Hall PR, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10976-80.
36. Botos I, Liu L, Wang Y, Segal DM, Davies DR. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochim Biophys Acta* 2009;1789:667-74.
37. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:13-25.
38. Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 2006;24:153-63.
39. Itoh K, Watanabe A, Funami K, Seya T, Matsumoto M. The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN- $\beta$  production. *J Immunol* 2008;181:5522-9.
40. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 2007;315:1398-401.
41. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
42. Tatematsu M, Ishii A, Oshiumi H, et al. A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J Biol Chem* 2010;285:20128-36.
43. Meylan E, Burns K, Hofmann K, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- $\kappa$ B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-7.
44. Choi YJ, Im E, Pothoulakis C, Rhee SH. TRIF modulates TLR5-dependent responses by inducing proteolytic degradation of TLR5. *J Biol Chem* 2010;285:21382-90.
45. Johnsen IB, Nguyen TT, Ringdal M, et al. Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *EMBO J* 2006;25:3335-46.
46. Manukyan M, Nalbant P, Luxen S, Hahn KM, Knaus UG. RhoA GTPase activation by TLR2 and TLR3 ligands: connecting via Src to NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 2009;182:3522-9.

47. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:1060-7.
48. Sarkar SN, Elco CP, Peters KL, Chattopadhyay S, Sen GC. Two tyrosine residues of Toll-like receptor 3 trigger different steps of NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 2007;282:3423-7.
49. Aksoy E, Vanden Berghe W, Detienne S, et al. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF- $\kappa$ B activation and IFN- $\beta$  synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. *Eur J Immunol* 2005;35:2200-9.
50. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:327-36.
51. Siednienko J, Halle A, Nagpal K, Golenbock DT, Miggin SM. TLR3-mediated IFN- $\beta$  gene induction is negatively regulated by the TLR adaptor MyD88 adaptor-like. *Eur J Immunol* 2010;40:3150-60.
52. Jouanguy E, Zhang SY, Chappier A, et al. Human primary immunodeficiencies of type I interferons. *Biochimie* 2007;89:878-83.
53. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006;7:131-7.
54. Murphy K, Travers P, Walport M. T-Zell-vermittelte Immunität. *Janeway Immunologie*, 7th Edn 2009.
55. Sladkova T, Kostolansky F. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. *Acta Virol* 2006;50:151-62.
56. Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 2004;322:231-8.
57. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3516-21.
58. Pichlmair A, Reis e Sousa. Innate recognition of viruses. *Immunity* 2007;27:370-83.
59. Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, et al. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007;317:1522-7.
60. Holm CK, Petersen CC, Hvid M, et al. TLR3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid induces IL-17A and IL-21 synthesis in human Th cells. *J Immunol* 2009;183:4422-31.
61. Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4<sup>+</sup> T cell survival. *J Immunol* 2004;172:6065-73.
62. Jiang W, Sun R, Wei H, Tian Z. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17077-82.

63. Wang J, Sun R, Wei H, Dong Z, Gao B, Tian Z. Poly I:C prevents T cell-mediated hepatitis via an NK-dependent mechanism. *J Hepatol* 2006;44:446-54.
64. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8459-64.
65. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Sato H, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 2008;205:1601-10.
66. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
67. Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 1998;8:451-60.
68. Casazza JP, Betts MR, Price DA, et al. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med* 2006;203:2865-77.
69. Romero V, Andrade F. Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens* 2008;71:409-16.
70. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536-41.
71. Sweeney SE, Kimbler TB, Firestein GS. Synoviocyte innate immune responses: II. Pivotal role of IFN regulatory factor 3. *J Immunol* 2010;184:7162-8.
72. Walker J, Tough DF. Modification of TLR-induced activation of human dendritic cells by type I IFN: synergistic interaction with TLR4 but not TLR3 agonists. *Eur J Immunol* 2006;36:1827-36.
73. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003;171:3154-62.
74. Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005;79:12273-9.
75. Heinz S, Haehnel V, Karaghiosoff M, et al. Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 2003;278:21502-9.
76. Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, et al. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R3.
77. Kaur S, Katsoulidis E, Plataniias LC. Akt and mRNA translation by interferons. *Cell Cycle* 2008;7:2112-6.

78. Simone R, Floriani A, Saverino D. Stimulation of Human CD4 T Lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Open Microbiol J* 2009;3:1-8.
79. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, et al. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 2004;23:1789-800.
80. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, et al. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest* 2009;119:2399-411.
81. Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3029-34.
82. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005;309:1380-4.
83. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2005;175:8051-9.
84. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.
85. Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Beladi S, et al. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med* 2010;207:2343-54.
86. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005;6:1245-52.
87. Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem* 2007;282:15325-9.
88. Lu R, Moore PA, Pitha PM. Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor  $\alpha$ : requirement for NF $\kappa$ B transcription factor and gene accessibility. *J Biol Chem* 2002;277:16592-8.
89. Ning S, Huye LE, Pagano JS. Regulation of the transcriptional activity of the IRF7 promoter by a pathway independent of interferon signaling. *J Biol Chem* 2005;280:12262-70.
90. Matsumoto M, Tanaka N, Harada H, et al. Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon- $\gamma$ . *Biol Chem* 1999;380:699-703.
91. Lundberg AM, Drexler SK, Monaco C, et al. Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems. *Blood* 2007;110:3245-52.
92. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005;5:375-86.

93. Kaur S, Uddin S, Platanias LC. The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:780-7.
94. Cheon H, Yang J, Stark GR. The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:33-40.
95. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000;12:1-13.
96. Dorion S, Berube J, Huot J, Landry J. A short lived protein involved in the heat shock sensing mechanism responsible for stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) activation. *J Biol Chem* 1999;274:37591-7.
97. Dorion S, Lambert H, Landry J. Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *J Biol Chem* 2002;277:30792-7.
98. Dubois MF, Bensaude O. MAP kinase activation during heat shock in quiescent and exponentially growing mammalian cells. *FEBS Lett* 1993;324:191-5.
99. Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF- $\kappa$ B. *EMBO J* 1991;10:3805-17.
100. Coornaert B, Carpentier I, Beyaert R. A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem* 2009;284:8217-21.
101. Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, et al. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol* 2000;20:6945-57.
102. Sasaki CY, Slemenda CF, Ghosh P, Barberi TJ, Longo DL. Traf1 induction and protection from tumor necrosis factor by nuclear factor- $\kappa$ B p65 is independent of serine 536 phosphorylation. *Cancer Res* 2007;67:11218-25.
103. Xue J, Thippegowda PB, Hu G, et al. NF- $\kappa$ B regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in cooperation with NFAT by binding to the intronic NF- $\kappa$ B site in the ICAM-1 gene. *Physiol Genomics* 2009;38:42-53.
104. Anwar KN, Fazal F, Malik AB, Rahman A. RhoA/Rho-associated kinase pathway selectively regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via activation of I $\kappa$ B kinase beta and phosphorylation of RelA/p65. *J Immunol* 2004;173:6965-72.
105. Holloway AF, Rao S, Chen X, Shannon MF. Changes in chromatin accessibility across the GM-CSF promoter upon T cell activation are dependent on nuclear factor  $\kappa$ B proteins. *J Exp Med* 2003;197:413-23.
106. Speir E, Yu ZX, Takeda K, Ferrans VJ, Cannon RO, III. Competition for p300 regulates transcription by estrogen receptors and nuclear factor- $\kappa$ B in human coronary smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;87:1006-11.
107. Chen LF, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- $\kappa$ B. *EMBO J* 2002;21:6539-48.

108. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000;20:6891-903.
109. Gomez-Gonzalo M, Benedicto I, Carretero M, et al. Hepatitis C virus core protein regulates p300/CBP co-activation function. Possible role in the regulation of NF-AT1 transcriptional activity. *Virology* 2004;328:120-30.
110. Eckner R, Ludlow JW, Lill NL, et al. Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 1996;16:3454-64.
111. Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, et al. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 1999;96:405-13.
112. Yeh PY, Yeh KH, Chuang SE, Song YC, Cheng AL. Suppression of MEK/ERK signaling pathway enhances cisplatin-induced NF- $\kappa$ B activation by protein phosphatase 4-mediated NF- $\kappa$ B p65 Thr dephosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:26143-8.
113. Teusch N, Lombardo E, Eddleston J, Knaus UG. The low molecular weight GTPase RhoA and atypical protein kinase Czeta are required for TLR2-mediated gene transcription. *J Immunol* 2004;173:507-14.
114. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem* 2004;279:55633-43.
115. Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND. Regulation of NF- $\kappa$ B and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *EMBO J* 2005;24:1157-69.
116. Mattioli I, Sebald A, Bucher C, et al. Transient and selective NF- $\kappa$ B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I $\kappa$ B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. *J Immunol* 2004;172:6336-44.
117. Chen LF, Williams SA, Mu Y, et al. NF- $\kappa$ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* 2005;25:7966-75.
118. Moreno R, Sobotzik JM, Schultz C, Schmitz ML. Specification of the NF- $\kappa$ B transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK  $\epsilon$ . *Nucleic Acids Res* 2010;38:6029-44.
119. Wang D, Baldwin AS, Jr. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent transcription by tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 1998;273:29411-6.
120. Chen CC, Wang JK. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* 1999;55:481-8.



121. Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE, et al. A novel mechanism for TNF- $\alpha$  regulation by p38 MAPK: involvement of NF- $\kappa$ B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2004;173:6928-37.
122. Kim HJ, Lee HS, Chong YH, Kang JL. p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF- $\kappa$ B activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages. *Toxicology* 2006;225:36-47.
123. Ji G, Liu D, Liu J, Gao H, Yuan X, Shen G. p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates NF- $\kappa$ B transcriptional activation through RelA phosphorylation during stretch-induced myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:547-51.
124. Beyaert R, Cuenda A, Vanden BW, et al. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996;15:1914-23.
125. Vanden BW, Plaisance S, Boone E, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- $\kappa$ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1998;273:3285-90.
126. Bird TA, Schooley K, Dower SK, Hagen H, Virca GD. Activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem* 1997;272:32606-12.
127. Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS, Jr. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* 2000;275:32592-7.
128. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. I $\kappa$ B kinases phosphorylate NF- $\kappa$ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 1999;274:30353-6.
129. Adli M, Baldwin AS. IKK-i/IKK $\epsilon$  controls constitutive, cancer cell-associated NF- $\kappa$ B activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J Biol Chem* 2006;281:26976-84.
130. Sayed M, Kim SO, Salh BS, Issinger OG, Pelech SL. Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2000;275:16569-73.
131. Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS. Molecular mechanisms of cancer. In: Finkel T, Gutkind JS, eds. *Signal transduction and human disease*, 1 Edn 2003.
132. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002;17:251-63.
133. Melchjorsen J, Paludan SR. Induction of RANTES/CCL5 by herpes simplex virus is regulated by nuclear factor  $\kappa$ B and interferon regulatory factor 3. *J Gen Virol* 2003;84:2491-5.
134. Sica A, Dorman L, Viggiano V, et al. Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the interferon- $\gamma$  promoter. *J Biol Chem* 1997;272:30412-20.

135. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002;72:847-55.
136. Trede NS, Tsytsykova AV, Chatila T, Goldfeld AE, Geha RS. Transcriptional activation of the human TNF- $\alpha$  promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 1995;155:902-8.
137. Rincon M, Enslen H, Raingeaud J, et al. Interferon- $\gamma$  expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J* 1998;17:2817-29.
138. Park SG, Schulze-Luehrman J, Hayden MS, et al. The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF- $\kappa$ B and activate T cells. *Nat Immunol* 2009;10:158-66.
139. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 2003;3:939-51.
140. Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005;24:7435-42.
141. Yu T, Junger WG, Yuan C, et al. Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298:C457-C464.
142. Krenger W, Falzarano G, Delmonte J, Jr., Snyder KM, Byon JC, Ferrara JL. Interferon- $\gamma$  suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996;88:1113-21.
143. Sedelies KA, Sayers TJ, Edwards KM, et al. Discordant regulation of granzyme H and granzyme B expression in human lymphocytes. *J Biol Chem* 2004;279:26581-7.
144. Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem* 2005;280:4663-73.
145. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ* 2010;17:616-23.
146. Buzza MS, Zamurs L, Sun J, et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* 2005;280:23549-58.

## Publikationsliste

### Originalarbeiten

- 1) „TLR3 signaling induces a stronger anti-viral immune response in human CD4 T cells than CD28 costimulation”  
**Meyer, T.**; Hans-Heinrich Oberg, H.-H.; Peters, C.; Martens, I.; Adam-Klages, S.; Kabelitz, D. and Wesch D.  
J. Leuk. Biol., (submitted)
- 2) “TLR-3 activation induces cell death and VEGF secretion in the RPE – a mechanism for development of choroidal neovascularisation in geographic atrophy.”  
Klettner, A.; Koinzer, S; **Meyer, T.**; Roeder, J.  
Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011 (submitted)
- 3) “Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands”  
Oberg, H.H.; Ly, T.T.; Ussat, S.; **Meyer, T.**; Kabelitz, D.; Wesch, D  
J. Immunol., 2010; 184(9): 4733-40
- 4) “Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells”  
Klettner, A.K.; Kruse, M.L.; **Meyer, T.**; Wesch, D.; Kabelitz, D.; Roeder, J.  
Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 2009, 247(12): 1601-8

### Kongressbeiträge

- 1) “Activation of TLR3 does not reduce VEGF secretion but induces concentration dependent cell death in porcine RPE”  
Klettner, A; Koinzer, S.; **Meyer, T.**; Roeder J.  
ARVO 2011 Annual Meeting, Fort Lauderdale, 2011
- 2) “Crosstalk of TLR3 and T cell receptor signaling pathways”  
**Meyer, T.**; Beetz, S.; Wesch, D.; Martens, I.; Kabelitz, D.  
2nd European Congress of Immunology, Berlin, 2009
- 3) “Direct Costimulatory Effect of dsRNA analog Poly(I:C) on T cells”  
**Meyer, T.**; Beetz, S.; Wesch, D.; Martens, I.; Kabelitz, D.  
4th Spring School on Immunology, Ettal, 2008
- 4) “Reciprocal enhancement of TLR3 and T cell receptor response”  
**Meyer, T.**; Beetz, S.; Wesch, D.; Martens, I.; Kabelitz, D.  
Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien, 2008

- 5) "Direct Costimulatory Effect of TLR3 Ligand Poly(I:C) on T cells"  
**Meyer, T.**; Beetz, S.; Wesch, D.; Martens, I.; Kabelitz, D.  
38. Jahrestagung der DGfI, Heidelberg, 2007
- 6) "Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on Jurkat cells"  
**Meyer, T.**; Beetz, S.; Martens, I.; Wesch, D.; Kabelitz, D.  
10th Joint Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar, 2006

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt gemäß § 9 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 12. Mai 2009, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Dr. T. Bosch selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die Abhandlung ist nach Form und Inhalt, abgesehen von der Beratung durch PD Dr. D. Wesch/ Prof. Dr. D. Kabelitz, die eigene Arbeit.

Weiterhin habe ich keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die wörtlich oder inhaltlich den verwendeten Werken entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Auszüge der Dissertation wurden in Fachzeitschriften eingereicht.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Kiel noch anderweitig versucht habe eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Kiel, den 11.08.2011

---

Tim Meyer

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Geboren am 23.06.1979 in Dortmund

Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulische Ausbildung und Hochschulstudium**

Seit 2006	Promotion zum Thema „Die Rolle von Toll-like Rezeptor 3 bei der Aktivierung primärer humaner CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten“ am Institut für Immunologie des Uniklinikums Schleswig Holstein am Campus Kiel
2004 - 2005	Diplomarbeit zum Thema „Die Bedeutung des 5' mRNA Capping Enzyms für die Spermatogenese von <i>D. melanogaster</i> “ an der Universität Kassel, bestanden mit der Note 1,4
1999.-.2005	Biologiestudium an der Universität Kassel mit den Schwerpunkten Entwicklungsbiologie, Genetik und Zellbiologie
1998 - 1999	Zivildienst in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Klinikum Ludwigsburg
1989 - 1998	Leibniz-Gymnasium, Dortmund

## **Danksagung**

Herzlichen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz und Frau PD Dr. Daniela Wesch aussprechen, dass sie mir die Möglichkeit eröffnet haben die vorliegende Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die mir am Institut für Immunologie geboten wurden, habe ich sehr geschätzt.

Für die tägliche Betreuung meiner Arbeit und Hilfestellung bei kleinen und großen Problemen bin ich besonders Frau PD Dr. Daniela Wesch und, zu Beginn meiner Arbeit, Frau Dr. Susann Beetz, zu Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. Dr. Thomas Bosch gebührt mein besonderer Dank für die freundliche Übernahme der Betreuung und des Referates meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Ferner danke ich Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz für die Übernahme des Korreferates.

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei Frau PD Dr. Alexa Klettner von der Klinik für Ophthalmologie am UK-SH in Kiel für die fruchtbare und interessante Kooperation.

Für das kritische Lesen der Arbeit gebührt Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz, Herrn Dr. Hans-Heinrich Oberg, Frau Juliane Fazio und besonders Frau PD Dr. Daniela Wesch mein Dank.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Dani, Heiner, Lothar, Ina, Sandra, Moni, Hoa, Jule und Pitt danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Ina, Sandra und Pitt danke ich besonders für die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfe bei Arbeiten im Labor.

Für das ausgezeichnete Arbeitsklima, lehrreiche und interessante Diskussionen und Unterhaltungen danke ich neben den oben genannten Personen außerdem Alyn, Anja, Birgit, Hamed, Hansi, Heike, Hendrik, Jette, Mathias, Kathrin, Markus, Maren, Melanie, Ottmar, Malte, Signe und allen die hier stehen sollten und die ich vergessen habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere Karina, die mich in den schwierigen Phasen der Arbeit und des Schreibens immer wieder aufgebaut und mich darin bestärkt hat, die Arbeit erfolgreich zu beenden.